

RÉPUBLIQUE TUNISIENNE

**MINISTÈRE DE
L'AGRICULTURE**

**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT
SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**Institution de la Recherche
et de l'Enseignement
Supérieur Agricoles**



INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE DE TUNISIE

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES AGRONOMIQUES
Spécialité : Sciences de la Production Végétale

**Diversité Génétique Intra et Interspécifique des
Porte-greffes d'Agrumes utilisés en Tunisie**

Apport des marqueurs SSRs nucléaires, des InDel mitochondriaux et de
la diversité allélique de gènes candidats pour la tolérance à la salinité

Présentée par : **Hager Snoussi Ep. Trifa**

Soutenue devant le Jury composé de:

Pr. Faicel Ben Jeddi
Dr. Sonia Hamza
Dr. Mehdi Ben Mimoun
Pr. Neila Trifi
Pr. Ahmed Mliki
Pr. Patrick Ollitrault

INAT, Président
INAT, Directrice de Thèse
INAT, Rapporteur
FST, Rapporteur
CBBC, Examineur
CIRAD, Examineur

Dédicaces

Je dédie ce travail de thèse

A la mémoire de mon père Baccar et de mon grand-père Salah

A ma mère

A Youssef

A Yassine

Aux familles Snoussi, Boudali, Trifa et Moalla

Remerciements

*Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent
du bonheur; elles sont les charmants jardiniers
par qui nos âmes sont fleuries.*

Marcel Proust

Et voilà, plusieurs années se sont écoulées, depuis le début de ce projet de thèse, pleines d'activités et des hauts et des bas! Aujourd'hui, c'est avec un réel plaisir et un bonheur intense que je vous présente l'accomplissement de ces années de travail à la fois fascinantes et exigeantes. Bien au-delà des acquis scientifiques, je ressors grandie de cette expérience. L'effort et le temps consacrés à la réalisation des objectifs de la thèse m'ont appris à repousser mes limites et à toujours persévérer.

Cette thèse, financée en grande partie par le projet Européen INCO CIBEWU a été l'objet d'un partenariat entre le CIRAD (France), l'IVIA de Valence (Espagne) et l'INRAT (Tunisie), dont je fais partie. Malgré mes efforts et ma détermination, l'aboutissement de ce projet aurait été impossible sans la contribution et le support de plusieurs personnes, organismes et institutions que je tiens ici à remercier sincèrement:

Dr. Robert Domaingue et Dr. Marie France Duval responsable successif de l'UR APMV puis de l'équipe APMV au sein de l'UMR AGAP ("Amélioration génétique et adaptation des plantes méditerranéennes et tropicales") du CIRAD, le Pr. Patrick Ollitrault, coordinateur du projet Européen INCO CIBEWU, le Dr. Florentino Juste, directeur de l'IVIA et le Dr Luis Navarro, directeur du centre de protection végétale et de biotechnologie de l'IVIA, pour leur accueil au sein de leurs équipes de recherche respectives et pour m'avoir permis de travailler dans d'aussi bonnes conditions. J'associe à mes remerciements les responsables de l'INRAT, du CIRAD, et de l'IVIA pour l'appui technique et financier.

Mes premières pensées vont d'abord à Mr Ollitrault Patrick que je remercie du fond de mon cœur pour la confiance qu'il m'a accordée et sa disponibilité à diriger cette thèse malgré ses nombreuses charges. Vous avez suivi de près la réalisation de mes travaux et votre compétence, votre rigueur scientifique et votre clairvoyance m'ont beaucoup appris. Merci pour vos précieux conseils et vos critiques constructives. Au-delà de vos enseignements, votre générosité et vos qualités humaines m'ont aidée à aller vers l'avant et à évoluer.

Mme Duval Marie-France, à laquelle je témoigne toute ma reconnaissance pour son soutien, sa patience, ses recommandations et son encadrement dans l'étude de la diversité génétique pour cette recherche. Votre soutien moral et vos encouragements m'ont beaucoup motivée pour arriver au terme de cette expérience.

Mme Hamza Sonia, docteur et maître de conférences à l'INAT, pour avoir participé à mon encadrement et pour son encouragement continu. Ses compétences et ses conseils m'ont beaucoup aidée.

Je remercie vivement Mme Zina Belfalah, chargée de recherche à l'INRAT, pour m'avoir accordée l'occasion de travailler avec elle dans le projet sur les agrumes. Ses conseils et son soutien m'ont aidée à aller vers l'avant et à persévérer dans mes recherches.

Mr Morillon Raphael, docteur au CIRAD, pour sa confiance, sa disponibilité et son estimable participation à la partie liée à la tolérance au stress salin.

J'adresse aussi mes sincères remerciements à Mr Hichem Ben Salem, directeur de recherche et directeur de l'INRAT, Mr Ben Mechlia, professeur à l'INAT et *ex* directeur de l'INRAT et Mr Harrabi Moncef, professeur à l'INAT, pour avoir cru en moi et pour leurs encouragements.

J'exprime mes plus sincères remerciements aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail et pour leur patience à lire le document. Je remercie Pr. Faicel Ben Jeddi (INAT) qui a bien voulu présider le jury. Je remercie Dr. Mehdi Ben Mimoun (INAT) et Pr. Neila Trifi (FST) pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'être les rapporteurs de cette thèse. Je les remercie pour la rapidité avec laquelle ils ont lu mon manuscrit, malgré leurs nombreuses occupations. Ils ont également contribué par leurs nombreuses remarques et suggestions à améliorer la qualité de ce mémoire, et je leur en suis très reconnaissante. Je remercie Pr. Ahmed Mliki (CBBC) et Pr. Patrick Ollitrault (CIRAD) pour avoir accepté d'examiner ce travail et d'y avoir apporté des remarques pertinentes. A tous, je leur suis très reconnaissante pour l'intérêt qu'ils ont porté à mes travaux de recherche, ceci tout en ayant un regard critique, juste, avisé et constructif.

Je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères à tous mes ami(e)s et à toutes les personnes qui m'ont aidée de près ou de loin dans la réalisation de ce travail. Je pense particulièrement à Dr. Andres Garcia-Lor (IVIA) et Dr. Franck Curk (chercheur à INRA-Corse), pour leurs conseils et leurs contributions sur la mise en place des protocoles expérimentaux et sur le traitement des données de séquençage obtenues. Je leur suis redevable du soutien, de l'assistance et de la sympathie dont ils m'ont témoignée à tout instant.

Mes profonds remerciements vont également à Dr. Xavier Perrier et Dr. Jean-Pierre Jacquemoud-Collet, chercheurs au CIRAD, pour leur précieuse contribution et conseils sur l'utilisation du logiciel Darwin.

J'associe mes remerciements à Dr. Yann Froelicher, chercheur au CIRAD, Dr. François Luro chercheur à l'INRA et Dr. Ange-Marie Risterucci, chercheur au CIRAD, pour leurs conseils et participation aux travaux impliquant les marqueurs microsatellites.

Mes profonds remerciements vont également aux responsables des parcs semenciers de Sbikha et d'El Gobba, du GIFruits, des CRDA, pour leur appui à la réalisation des prospections dans tout le pays, et pour nous avoir facilité le contact avec les pépiniéristes et les cultivateurs.

Je remercie également Dr. Mohamed Cherif, enseignant-chercheur et directeur général du Centre Technique des Agrumes, ainsi que Mr Mehdi Mabrouk, ingénieur en chef et Mr Brahim Messelmani, ingénieur des travaux, pour leur aide et leur soutien durant les travaux de prospections et de collecte des échantillons.

Je remercie toutes les personnes formidables que j'ai rencontrées par le biais du CIRAD et de l'IVIA. Je pense particulièrement à toutes les assistantes des équipes-projets, à toutes les personnes du service de coopération (ATCT) et en particulier à Mr Noureddine Karoui, Chef de service de la gestion des programmes et projets (ATCT). Je ne saurai oublier de remercier toutes les personnes dans l'ombre dont la contribution à mon travail est non négligeable, les administrateurs, les conducteurs, les techniciens et les ouvriers.

A tous ceux qui ont apporté leur pierre à cet édifice, particulièrement à mes chères amies Mme Emna Jedidi, Mme Mounira Harbi, Mme Asma Najjar, Melle Rym Bouhlal et à Mr Ahmed Jemmali, tous de l'INRAT.

Enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à mes parents, à ma famille et à ma belle famille. Qu'ils reçoivent ici toute ma reconnaissance pour leur encouragement et leur soutien durant la réalisation de cette thèse, que la grâce de Dieu soit avec vous.

Mention spéciale à mes chers maman, oncle Abderrahmane, ma sœur Hend, mon frère Haithem, mes beaux-parents Chedly et Sarra, mon oncle Zoubair, mes tantes Nabila, Chahra et Selwa, mes chers cousins et cousines et mes nièces et neveux, leur confiance, leur tendresse et leur amour me portent et me guident tous les jours. Je vous aime.

A mon mari Youssef Trifa qui a toujours été là pour moi. Très humblement, je voudrai te dire merci pour ton soutien pendant mes périodes d'éloignement, de doutes et pour tes multiples encouragements.

Une pensée pour terminer ces remerciements pour vous, papa Baccar, baba Salah et lalla Béhija, même n'étant pas avec nous, je sais que vous en auriez été fiers de votre fille!!!

ملخص

إن استمرارية قطاع الحمضيات في تونس تخضع في جزء كبير الى تنوع الانتاج كذلك يهتم إستعمال أصول تضم طاقة تكيف مع الاجهادات الحيوية و البيئية، وتمنح النوع ثمارا ذات جودة عالية و إنتاجية حسنة. مع غياب أصول تستجيب الى كافة هذه المعايير فإن إنتقاء و إنتخاب أصول جديدة يشكل رهانا كبيرا. في تونس تستعمل، بالإضافة الى الأرنج، أصول أخرى مثل الليمون و الليمون الحامض تتميز بتأقلمها للعوامل المناخية و التربة الموجودة بالجنوب التونسي خاصة. إن معرفة و إدارة هذه الموارد الوراثية المحلية يعتبر مكسبا هاما و ركيزة أساسية يمكن إستعمالها في برامج الانتخاب و التحسين الوراثي.

و من ذلك، تم من خلال هذا البحث تحليل التنوع الوراثي لمجموعة تتكون من 201 فردا من أصناف الحمضيات المستعملة محليا و التابعة لأربعة أنواع ابومكسيكية اختيارية

(*C. aurantium*, *C. sinensis*, *C. limon* et *C. aurantifolia*)

تمثل أربعة مجموعات نوعية كبرى على التوالي (الأرنج، البرتقال، الليمون و الليمون الحامض). لإتمام هذه الدراسة، تم اضافة 23 نوعا نباتيا مرجعا، يمثلون التنوع الاجمالي للأنواع الموجودة في تونس.

إن دراسة 20 واسم جزيئي نووي لتكرار التسلسل البسيط (SSRs) و 4 واسم سبجي من فئة إقحام/حذف

(InDel) قد مكنت من تقييم التنوع الوراثي لأصول الحمضيات المستعملة بتونس في اطار النوع من جهة و البيئي من جهة أخرى و بينت المعالم الوراثية و دراسة المفارقات الجينية وجود تركيبة وراثية قوية

للبلازما الجرثومية التونسية، موصولة تماما بالتمايز بين المجموعات النوعية. من جهة أخرى تبين وجود إرتفاع كبير في مستوى الافراد غير المتباينة وراثيا داخل كل نوع.

16 تركيبا مختلفا متعدد المواقع الوراثية (MLGs) قد تم التعرف عليهم، 10 منهم يمثلون نوع الأرنج.

غير أن معظم أفراد الأرنج ينتمون الى تركيبين وراثيين متعددين المواقع الوراثية، يميزهما أليل واحد. كما مكنت التحاليل الجزيئية للتراكيب الوراثية المختلفة (SSRs, SNPs, InDels)

بالمقارنة مع الأنواع المرجعية من تحديد العمليات التي يمكن إعتبارها مصدرا للتنوع الوراثي في إطار النوع: (1) تعدد الادخالات من موارد مختلفة، (2) الطفرة الملحقة بالموارد المحلية و (3) التوليف الجنسي.

كما أثبتت النتائج أن مساهمة كل من هذه العمليات تختلف إسنادا الى النوع المعنى به. بالنسبة لأنواع البرتقال و الليمون و التي دلت على ارتفاع مستوى الأفراد ذات البدائل (الأليلات) غير المتطابقة، مع كشف تغيب أو قلة التنوع الجزيئي في إطار النوع، تبين أنه لا علاقة للتوليف الجنسي في حين ينسب التنوع الضعيف المتواجد الى إنتقاء الطفرة ذات الأهمية. لدى نوع الأرنج، يكون التوليف الجنسي مصدرا لسبعة أفراد. أما بالنسبة للليمون الحامض فإن التعرف على تركيبيتين وراثيتين تونسيتين مطابقة لمراجع أجنبية تقترض على الأقل ادخاليتين. كما بينت نتائج هذا الجزء أن الليمون الحامض "الشعيري" يمكن أن ينتج عن التهجين الجنسي البيئي ما بين ليمون حامض من فئة "مكسيكان" و أترنج، قد حدث في تونس. لذا، بالرغم من ندرتهم لدى أنواع الحمضيات الأبومكسيكية، فإن بعض الأفراد الناجمة عن الاستيلاد أو عن التهجين البيئي قد وقع انتقائهم من قبل المزارعين، الشيء الذي ساهم بنفس طريقة الطفرة، إلى انشاء بلازما جرثومية مستحدثة.

كما قمنا بدراسة التنوع الأليلي لدى 6 موروثات مرشحة و قد تطلب هذا البحث عن عديد (SNPs) لدى 54 فردا من الحمضيات (بما في ذلك التراكيب المختلفة متعددة المواقع الوراثية التونسية ممثلة لجنس *Citrus* و تشمل الأصنوفات السلفية (*C. maxima*, *C. medica*, *C. reticulata*, *C. micrantha*) و الأنواع الثانوية الخمسة التي تنشأ عنها (*C. aurantium*, *C. sinensis*, *C. limon*, *C. paradisi*, *C. aurantifolia*).

إن تسلسل سانقر لأكثر من 4 كيلوبيز من د ن أ الستة أجزاء التابعة للموروثات النووية كشفت عن 121 SNPs.

تسعة و تسعون من هذه المواقع الوراثية موجودة لدى الأصنوفات السلفية. أظهرت دراسة مستوى عديد التكوين وحيد النيوكليوتيد بين الأفراد داخل و بين الأصنوفات السلفية مستويات تمايز هامة بين هذه الأصنوفات مع مقارنتها بالتنوع داخل كل أصنوفة. كما تطلعننا إلى تحليل تاريخ نشوء الأليلات الموجودة لدى الأنواع الثانوية بالنسبة لكل مورث و تؤيد النتائج الفرضيات المقترحة لتفسير الأصل البيني لهذه الأنواع. إن التنظيم الوراثي لجنس *CITRUS* الناتج عن بيانات SNPs , يتلائم مع العلاقات الوراثية

المستنتجة من خلال بيانات التحاليل الجزيئية SSRs مما يجعلنا نعتقد أن تركيبات التنوع الراجعة

لصنفي الواسمين SSRs و SNPs يمكن لها أن تنتج عن عوامل تطوير لنفس الأنموذج.

في حين أن بعض المؤشرات لإنتخاب موجب تم التوصل إلى كشفها و ذلك بالنسبة الموروثين

Sos1 و *Nrt1a* , و المعروف أنهما أساسيين لدى النباتات المتحملة للملوحة , مما يطرح إمكانية

دورهم في تنوع و إختلاف الشكل الظاهري.

إن الإكتثار المطابق للأصول يعتبر عنصرا رئيسيا للقدرة الزراعية. في هذا الشأن قمنا بدراسة التطابق الوراثي لأصول الحمضيات بمجموعات تونسية الشيء الذي مكننا من كشف غياب تجانس التكوين لدى عديد الأفراد و بعض الحالات التي تشكو عدم التطابق مع التراكيب الوراثية لمجموعة كرسিকা المرجعية. عدد من الإرشادات تم صياغتها لممثلي القطاع مما يشكل وسيلة لتنمين و إستغلال هذه النتائج لتطوير خطط البحث العلمي في إطار تنوع الأصول التونسية.

Résumé

La durabilité du secteur agrumicole en Tunisie dépend en grande partie de la diversification de la production ainsi que l'utilisation de porte-greffes cumulant des tolérances aux stress biotiques et abiotiques, tout en conférant à la variété une bonne qualité des fruits et une bonne productivité. En l'absence de porte-greffe répondant à l'ensemble de ces critères, la sélection de nouveaux porte-greffes est un enjeu majeur. En Tunisie sont utilisés, en plus du bigaradier, d'autres porte-greffes comme les citrons et les limes bien adaptés aux conditions pédoclimatiques difficiles rencontrées dans le Sud de la Tunisie. La connaissance et la gestion de telles ressources génétiques est donc importante pour les programmes de sélection et d'amélioration génétique.

A cette fin, la diversité génétique de 201 accessions appartenant à 4 espèces apomictiques facultatives (*C. aurantium*, *C. sinensis*, *C. limon* et *C. aurantifolia*) correspondant à quatre grands groupes variétaux (bigaradiers, orangers, citronniers et limettier, respectivement), a été étudiée. Pour compléter cette étude, un jeu de 23 accessions de référence, représentatives de la diversité globale des espèces rencontrées en Tunisie, a été inclus. Vingt marqueurs SSRs nucléaires et 4 InDel mitochondriaux ont permis d'estimer la diversité génétique intra et interspécifique des porte-greffes d'agrumes tunisiens. Les paramètres génétiques et l'analyse des dissimilarités ont indiqué une forte structuration génétique du germoplasme Tunisien, totalement liée à la différenciation entre groupes variétaux. Les niveaux d'hétérozygotie sont par ailleurs très élevés au sein de chaque espèce. Seize génotypes multilocus (MLGs) distincts ont été identifiés, dont 10 représentatifs des bigaradiers. Toutefois, la majorité des bigaradiers correspondent à 2 MLGs, différenciés par un seul allèle. L'analyse moléculaire (SSRs, SNPs et InDels) des MLGs Tunisiens comparativement aux variétés de référence a permis d'identifier trois processus à l'origine de la diversification intraspécifique : (1) les introductions multiples à partir de matériel diversifié, (2) les mutations du matériel local et (3) la recombinaison sexuée. La contribution de chacun de ces processus varie en fonction de l'espèce considérée. Pour les orangers et les citronniers qui présentent un niveau d'hétérozygotie très élevé et pas ou très peu de diversité moléculaire intraspécifique, la recombinaison sexuée n'est pas intervenue et la faible diversification existante peut être attribuée à la sélection de mutations d'intérêt. Chez les bigaradiers la recombinaison sexuée serait à l'origine de sept accessions. Pour les limes, l'identification de deux MLGs Tunisiens identiques à des références d'autres pays suggère au moins deux introductions. La lime 'Chiiri', pourrait résulter d'une hybridation sexuée interspécifique, entre une lime de type 'Mexicain' et un cédrat, survenue en Tunisie. Ainsi, bien que rares chez les espèces d'agrumes apomictiques, certains individus issus d'autofécondation ou de croisements interspécifiques ont été sélectionnés par les agriculteurs, contribuant au même titre que les mutations, à la constitution d'un germoplasme original.

L'étude de la diversité allélique des six gènes candidats a impliqué la recherche des polymorphismes SNPs chez 54 accessions d'agrumes (y compris les MLGs tunisiens) représentatifs du genre *Citrus* et incluant les taxons ancestraux (*C. maxima*, *C. medica*, *C. reticulata* et *C. micrantha*) et les cinq espèces secondaires qui en découlent (*C. aurantium*, *Citrus sinensis*, *Citrus limon*, *Citrus paradisi*, *Citrus aurantifolia*). Le séquençage Sanger de plus de 4 Kb issus de 6 fragments de gènes nucléaires a révélé 121 SNPs. Quatre vingt dix neuf de ces loci sont présents chez les taxons de base. L'analyse des degrés moyens de polymorphisme inter-accessions au sein et entre les taxons de base a révélé des niveaux de différenciation importants entre les taxons ancestraux comparativement à la diversité intrataxon. L'origine phylogénétique des allèles présents chez les espèces secondaires a été analysée pour chaque gène et confirme les hypothèses sur l'origine interspécifique de ces espèces. L'organisation génétique du genre *Citrus* obtenue à partir des données SNPs concorde avec les relations génétiques révélées avec les données des marqueurs SSRs ce qui laisse supposer que les structures de diversité relatives aux deux types de marqueurs SNPs et SSRs pourraient dériver de composantes évolutives d'un même type (neutre). Des indices d'une sélection positive ont cependant été observés pour les gènes *Nrt1a* et *Sos1*, déterminants très importants de la tolérance à la salinité, suggérant qu'ils puissent jouer un rôle dans la différenciation phénotypique.

La propagation conforme des porte-greffes est un élément clef de la performance agronomique en verger. L'analyse de la conformité génétique des porte-greffes d'agrumes en collections tunisiennes a été réalisée et a permis de dévoiler une hétérogénéité au sein de certaines accessions et certains cas de non conformité par rapport aux génotypes de la collection de référence Corse. Des recommandations ont été formulées aux acteurs de la filière, constituant une valorisation immédiate au niveau du développement des actions de recherche sur la diversité des porte-greffes tunisiens.

Mots clés: porte-greffe, agrumes, microsatellites, diversité génétique, SNPs, *Citrus*, apomixie, mutation, gène candidat, tolérance à la salinité, espèce secondaire, conformité et homogénéité génétique

Abstract

The sustainability of the citrus industry in Tunisia largely depends on the production diversification as well as the use of rootstocks combining tolerances to biotic and abiotic stress, while providing to the variety a good fruit quality and a good level of productivity. Without existing rootstock responding to all of these criteria, the selection of new rootstocks is a major issue.

In Tunisia, in addition to sour orange, other rootstocks are used, such as lemons and limes well adapted to difficult pedoclimatic conditions encountered in southern Tunisia. Knowledge and management of such genetic resources is therefore important for selection and breeding programs.

For this purpose, the genetic diversity of 201 accessions belonging to 4 facultative apomictic species (*C. aurantium*, *C. sinensis*, *C. limon* et *C. aurantifolia*) corresponding to four main varietal groups (sour orange, oranges, lemons and limes, respectively), was studied. To complete this study, a set of 23 reference accessions, representative of global diversity of species encountered in Tunisia, was included. Twenty nuclear SSRs markers and 4 mitochondrial Indels allowed the assessment of intra and interspecific genetic diversity of Tunisian citrus rootstocks. Genetic parameters and dissimilarity analysis indicated a strong genetic structure of Tunisian germplasm, highly linked to the differentiation between varietal groups. Heterozygosity levels are in addition very high within each species. Sixteen distinct multilocus genotypes (MLGs) have been identified, 10 of them are representative of sour oranges. However, the majority of sour oranges correspond to 2 MLGs, differentiated by only one allele. The molecular analysis (SSRs, SNPs and InDels) of Tunisian MLGs comparatively to reference varieties allowed us to identify three processes as the source of intraspecific diversification (1) multiple introductions from diversified material, (2) mutations of local material and (3) sexual recombination. The contribution of each one of these processes varies according to the considered species. For the oranges and the lemons which display a very high heterozygosity level and little or no intraspecific molecular diversity, sexual recombination was not involved and the existing low polymorphism can be attributed to the selection of mutations of interest. In sour oranges, sexual recombination has been at the origin of seven accessions. For limes, the identification of two Tunisian MLGs identical to references from other countries suggests at least two introductions. The 'Chiiri' lime, could result from an interspecific sexual hybridization, between a lime of 'Mexican' type and a citron, that occurred in Tunisia. Thus, although rare in apomictic citrus species, certain individuals resulting from selfing or interspecific crosses were selected by farmers, contributing in the same way as mutations, to the establishment of original germplasm.

The study of six candidate genes allelic diversity involved the research of SNPs polymorphisms in 54 citrus accessions (including Tunisian MLGs) representative of *Citrus* genus including four ancestral taxa (*C. maxima*, *C. medica*, *C. reticulata* et *C. micrantha*) and five secondary species resulting from their combination (*C. aurantium*, *Citrus sinensis*, *Citrus limon*, *Citrus paradisi*, *Citrus aurantifolia*). Sanger sequencing of more than 4 Kb from PCR-amplified fragments for 6 nuclear genes revealed 121 SNPs. 99 of these loci are present in basic taxa of cultivated citrus. The analysis of mean inter-accessions polymorphism degrees, within and between basic taxa, revealed important levels of differentiation between ancestral taxa comparatively to the intrataxon diversity.

The phylogenetic origin of the alleles present in secondary species was analysed for each gene and confirms the assumptions made for the interspecific origin of these species. The genetic organization of *Citrus* genus obtained from SNPs data is in agreement with genetic relationships proved with SSRs markers data which suggests that diversity structures relating to both types of markers SNPs and SSRs could derive from evolutive factors of the same type (neutral). Evidences of positive selection have been observed, however, for the genes *Nrt1a* and *Sos1*, important determinant of the salt tolerance, suggesting that they can play a role in phenotypic differentiation.

Conform propagation of rootstocks is a key tool of the agronomic performance in orchards.

Genetic conformity analysis of Citrus rootstocks in Tunisian collections was carried out and allowed to reveal an heterogeneity within certain accessions and some cases of non conformity compared with genotypes of Corsican reference collection. Recommendations were given to sector stakeholders, representing an immediate contribution, of the research actions on Tunisian rootstock diversity, to the development of the Tunisian citrus industry.

Key word: rootstock, Citrus, microsatellites, genetic diversity, SNPs, *Citrus* genus, apomixis, mutation, gene candidate, salt tolerance, secondary species, genetic conformity and homogeneity

Sommaire

Introduction Générale	1
Objectifs de la thèse.....	6

Synthèse bibliographique

I- Les agrumes - importance économique

1-1- A l'échelle mondiale	9
1-2- A l'échelle du bassin méditerranéen	10
1-3- A l'échelle de la Tunisie.....	12

II- Les contraintes de l'agrumiculture méditerranéenne et tunisienne

2-1- Les contraintes biotiques	15
2-2- Les contraintes abiotiques	
2-2-1- Problème du manque d'eau	16
2-2-2- Sols calcaires	18
2-2-3- Salinité des sols et des eaux d'irrigation.....	18
2-2-4- Réchauffement climatique.....	21
2-2-5- Contraintes structurelles et économiques	21

III- Biologie et évolution des agrumes

3-1- Taxonomie	23
3-2- Biologie de la reproduction chez les agrumes	24
3-2-1- Embryonie nucellaire et apomixie.....	25
3-2-2- Stérilité gamétique, autoincompatibilité et parthénocarpie	26
3-3- Ploïdie.....	27
3-4- Origine et histoire des agrumes cultivés	29
3-5- La création et la sélection de variétés chez les agrumes.....	33
3-6- Organisation de la diversité génétique et phénotypique	
3-6-1- Diversification interspécifique	35
- Variabilité agro-morphologique	37
- Variabilités biochimique et moléculaire	39
- Structuration globale des formes cultivées.....	39
3-6-2- Diversification intraspécifique	40

IV- Les marqueurs moléculaires et leur apport pour la gestion des ressources génétiques et l'amélioration des plantes

4-1- Les collections d'agrumes au niveau international	44
4-2- Les marqueurs moléculaires	47
4-2-1- Les microsatellites	47
4-2-2- Les SNPs	49
4-3- Génétiques moléculaires et étude de la diversité génétique	51

V- Intérêt des porte-greffes pour répondre aux contraintes du Bassin Méditerranéen

5-1- Apport du porte-greffe	53
5-2- Critères de choix d'un porte-greffe	55
5-3- Les principaux porte-greffes des agrumes	56
5-4- Le bigaradier.....	57
5-5- Les objectifs d'amélioration des porte-greffes pour le bassin méditerranéen et la Tunisie	59

VI- Les méthodes d'amélioration des porte-greffes d'agrumes

6-1- L'amélioration conventionnelle.....	60
6-2- L'apport des biotechnologies	
6-2-1- Hybridation somatique	61
6-2-2- La transformation génétique.....	62

VII- Impact du stress salin et mécanismes de tolérance à la salinité

7-1- Les différentes composantes d'un stress salin et leurs implications sur la physiologie et le développement des plantes.....	64
7-2- Effet du stress salin sur la croissance et la qualité des fruits	65
7-3- Perception et transduction du signal salin	67
7-4- Tolérance au sel chez les plantes	
7-4-1- Diversité adaptative des plantes à un environnement salin.....	68
7-4-2- Mécanismes de tolérance au stress salin	69
-Tolérance au stress osmotique ou homéostasie osmotique.....	70
-Tolérance au stress ionique ou homéostasie ionique	72
* L'influx et l'efflux de Na^+ au niveau des racines	73
- Recircularisation du sodium.....	75
- Compartimentation vacuolaire du sodium	76
- Coordination des voies.....	76
- Tolérance par compartimentation tissulaire	78
- L'accumulation de K^+ dans le cytoplasme	79
7-5- Accumulation et distribution des ions chlorure et sodium chez les agrumes en condition de stress salin.....	80
7-6- L'amélioration génétique des agrumes pour la tolérance à la salinité	
7-6-1- Amélioration conventionnelle	83
7-6-2- La mutagenèse <i>in vitro</i>	84
7-6-3- Utilisation de la ploïdie	84
7-6-4- Ingénierie génétique	86
7-6-5- Gènes candidats.....	90

Chapitre I: Étude de la diversité génétique des porte-greffes d'agrumes utilisés en Tunisie

I-Introduction	95
-----------------------------	-----------

II- Matériels et méthodes

2-1- Matériel végétal	95
2-2- Méthodologie	
2-2-1- Extraction d'ADN.....	98
2-2-2- Analyse moléculaire.....	98
2-2-3- Analyse de la diversité	103

III- Résultats

3-1- Résultats de la prospection, diversité et appellations locales des accessions d'agrumes utilisées comme porte-greffes	107
3-2- Diversité génétique du germoplasme tunisien	
3-2-1- Diversité allélique et son organisation	109
3-2-2- Diversité génotypique	113
3-3- Comparaison du germoplasme local avec les accessions de référence	
3-3-1- Marqueurs nucléaires	117
3-3-2- Marqueurs mitochondriaux	120

IV- Discussion

- La structuration interspécifique constitue un élément majeur de la variabilité du germoplasme Tunisien 122
- Diversité intraspécifique du germoplasme Tunisien 123

Chapitre II: Étude de la diversité allélique des gènes candidats de tolérance à la salinité- structuration au sein du genre *Citrus* et diversité du germoplasme tunisien

I- Introduction	131
------------------------------	------------

II- Matériel et Méthodes

2-1- Matériel végétal	133
2-2- Gènes candidats et amorces relatives	137
2-3- Amplification PCR	139
2-4- Séquençage des fragments de gènes	140
2-5- Analyse du polymorphisme de séquences	140
2-5- Analyse phylogénétique	141
2-6- Analyse Neighbor-Joining (NJ).....	141
2-7- Analyse en composantes principales (ACP).....	142

III- Résultats et interprétations

3-1- Découverte des SNPs et analyse de la diversité des loci polymorphes	143
3-2- Analyse de la diversité à l'échelle intra et inter-taxon- écart au modèle d'Hardy Weinberg et niveau de différenciation entre espèces	146
3-3- Test statistique de neutralité et structure haplotypique chez les agrumes " <i>vrais</i> ", la population totale et l'échantillon Tunisien	149

3-4- Diversité au niveau protéique	152
3-5- Analyse de la phylogénie moléculaire.....	156
3-6- Structure génomique des espèces secondaires et des hybrides - cas des accessions Tunisiennes.....	160

IV- Discussion

4-1- Découverte des marqueurs SNPs, degrés et profils de polymorphisme nucléotidique et utilité des SNPs dans l'analyse de la diversité et des études phylogénétiques du genre <i>Citrus</i>	180
4-2- Évolution des gènes chez les agrumes.....	184
4-3- Relations phylogénétiques	
4-3-1- Organisation de la diversité ancestrale du genre <i>Citrus</i>	190
4-3-2- Structure en mosaïque des espèces secondaires basée sur les génotypes de référence.....	193
4-3-3- Origine du polymorphisme intra espèce secondaire en Tunisie.....	197

Chapitre III: Analyse de la conformité génétique des porte-greffes d'agrumes des collections en Tunisie

I- Introduction.....	204
-----------------------------	------------

II- Matériel et Méthodes

2-1- Matériel végétal	
2-1-1- Parcs semenciers.....	206
2-1-2- Collection de travail de L'INRAT	207
2-2- Méthodologie	
2-2-1- Extraction d'ADN.....	209
2-2-2- Détermination de la ploïdie des individus par cytométrie en flux	209
2-3- Choix des amorces microsatellites	210
2-4- Amplification de l'ADN par PCR et analyse des loci microsatellites par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) dénaturant	211
2-5- Analyse des données.....	211

III- Résultats et discussion

3-1- Détermination de la ploïdie des porte-greffes	212
3-2- Diversité observée des porte-greffes analysés.....	214
3-3- Conformité et homogénéité	215

Discussions générales, conclusions et recommandations	225
--	------------

<i>Références bibliographiques</i>	236
--	-----

<i>Annexes</i>	274
----------------------	-----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA: **A**cide **A**miné

ADN: **A**cide **D**ésoxyribo**N**ucléique

ADNcp: **A**DN **C**hloro**P**lastique

ADNmt: **A**DN **M**itochondrial

ADNr: **A**DN **R**ibosomal

AFLP: **A**mplification **F**ragment **L**ength **P**olymorphism

AOC: **A**ppellation d'**O**rigine **C**ontrôlée

ARN: **A**cide **R**ibo**N**ucléique

ARNt: **A**RN de **T**ransfert

ATP: **A**dénosine **T**ri**P**hosphate

BAC: **B**acterial **A**rtificial **C**hromosome

CAPS: **C**leaved **A**mplified **P**olymorphic **S**equence

cDNA: **C**omplementary **D**N**A** (**A**DN **C**omplémentaire)

CIRAD: **C**entre de **C**oopération **I**nternationale en **R**echerche **A**gronomique pour le **D**éveloppement

CRDA: **C**ommissariat **R**égional de **D**éveloppement **A**gricole

CTA: **C**entre **T**echnique des **A**grumes

CTV: **C**itrus **T**risteza **V**irus

DDRT: **D**ifferential **D**isplay **R**everse **T**ranscription

dNTP: **d**ésoxy**N**ucléotides **T**riphos**P**hate

EDTA: **E**thylene**D**initro **T**etraacetic **A**cid

EST: **E**xpressed **S**equence **T**ags

FAO: **F**ood and **A**griculture **O**rganisation

GIFruits: **G**roupement **I**nterprofessionnel des **F**ruits

IGP: **I**ndication **G**éographique **P**rotégée

Indel: **I**nsertion/ **D**élétion

Indel: **I**nsertion/ **D**élétion

IPGRI: **I**nternational **P**lant **G**enetic **R**esources **I**nstitute

IRAP: **I**nter-**R**etrotransposon **A**mplified **P**olymorphism

ISSR: **I**nter **S**imple **S**equence **R**epeats

ITS: **I**nternal **T**ranscribed **S**pacer

IVIA: **I**nstituto **V**alenciano de **I**nvestigaciones **A**grarias

Kb: **Kilobase**

MAPK : **Mitogen-Activated Protein Kinase**

MAS: **Marker Assisted Selection**

Mb: **Mégabase**

NGS: **Next Generation Sequencing**

NJ: **Neighbor-Joining**

OTU: **Operational Taxonomic Unit**

Pb: **Paire de bases**

PCR: **Polymerase Chain Reaction**

QTL: **Quantitative Trait Loci**

RAPD: ***Random Amplification of Polymorphic DNA***

REMAP: **Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism**

RFLP: **Restriction Fragment Length Polymorphism**

ROS: **Reactive Oxygen Species**

RNS: **Reactive Nitrogen Species**

RT-PCR: ***Reverse Transcriptase PCR***

SAU: **Surface Agricole Utile**

SCAR: **Sequence-Characterized Amplified Region**

SNP: **Single Nucleotide Polymorphism**

SRA: **Station de Recherches Agronomiques**

SRAP: **Sequence Related Amplified Polymorphism**

SSCP : **Single Strand Conformation Polymorphism**

SSR: **Simple Sequence Repeats**

STMS: **Sequence-Tagged Microsatellite Site**

STS: **Sequence Tagged Site**

TAE: **Tris-Acetate-EDTA**

TBE: **Tris/Borate/EDTA**

UGMS : **UniGene derived Microsatellite**

UPOV: **Union Internationale pour la Protection des Obtentions Végétales**

USDA: **United States Department of Agriculture**

LISTE DES FIGURES

Figure n°1: Production des fruits d'agrumes dans le monde (Khan & Kender, 2007).....	10
Figure n°2: Répartition de l'effectif des superficies d'agrumes cultivées par gouvernorat.....	13
Figure n°3: Production nationale d'agrumes selon les espèces durant la campagne 2011/2012 (GIFruits, 2012).....	14
Figure n°4: Évolution de la production des agrumes sur les 20 dernières années (Source: GIFruits).....	15
Figure n°5: Disponibilité mondiale de l'eau douce en mètre cubique par personne et par an (Source: FAO, Nations Unies, Institut des Ressources Mondiales (WRI), 2008).....	17
Figure n° 6: Région d'origine, dispersion et zones de diversification des agrumes cultivés (Ollitrault <i>et al.</i> , 1999).....	31
Figure n° 7: Diversité morphologique : représentation du premier plan factoriel de l'AFTD réalisée sur une matrice de distance de Sokal et Michener entre 74 cultivars sur la base de 20 descripteurs végétatifs (Ollitrault <i>et al.</i> , 1999).....	38
Figure n°8: Arbre NJ avec 1097 marqueurs SNPs identifiés chez les espèces ancestrales des agrumes et leurs espèces apparentées (1000 bootstraps réalisés). Les supports des branches supérieurs à 50% sont présentés (Garcia-Lor <i>et al.</i> , 2013).....	43
Figure n°9: Relations génétiques entre les espèces d'agrumes et les taxons de base (analyse factorielle; axes 1/2) (Garcia-Lor <i>et al.</i> , 2013).....	44
Figure n°10: Mécanismes de transports passifs et actifs de Na ⁺ et Cl ⁻ au niveau des deux interfaces sol-racine et cellule-vaisseau du xylème dans les racines (Munns et Tester, 2008).....	74
Figure n°11: Régulation de l'homéostasie ionique par la voie de signalisation SOS pour l'adaptation au stress salin (Türkan et Demiral, 2009).....	77
Figure n°12: Les types majeurs de signalisation et leur implication pour les plantes durant les stress abiotiques : froid, sécheresse ou salinité (Xiong <i>et al.</i> , 2002).....	78
Figure n°13: Distribution géographique des accessions Tunisiennes collectées.....	108
Figure n°14: Arbre Neighbor-Joining enraciné illustrant l'organisation de la diversité génétique au sein des 201 accessions utilisées comme porte-greffes des agrumes en Tunisie (marquage radioactif).....	114
Figure n°15: Arbre Neighbor-Joining illustrant les relations génétiques entre les MLGs Tunisiens (16) et les accessions de référence (23), analysés avec 20 loci SSRs nucléaires.....	119
Figure n°16: Relations maternelles entre les génotypes Tunisiens et les accessions de référence analysés avec les 4 marqueurs indel mitochondriaux (arbre NJ).....	121

Figure n°17: Phylogénie de la structuration de la protéine issue du gène <i>Nrt1a</i> chez les taxons de base des agrumes, les hybrides et les accessions tunisiennes.....	154
Figure n°18: Phylogénie de la structuration de la protéine issue du gène <i>Sos1</i> chez les taxons de base des agrumes, les hybrides et les accessions tunisiennes.....	155
Figure n°19: Représentation graphique de l'arbre phylogénétique enraciné des taxons Ancetsraux.....	157
Figure n°20: Arbre Neighbor-Joining obtenu avec 121 marqueurs SNPs issus des 6 gènes candidats analysés chez les espèces ancestrales d'agrumes.....	159
Figure n°21: Arbre Neighbor-Joining obtenu avec 121 marqueurs SNPs issus des 6 gènes candidats analysés chez les espèces ancestrales et secondaires des agrumes.....	161
Figure n°22: Arbres Neighbor-joining obtenus chez les espèces d'agrumes ancestrales et leurs hybrides avec les marqueurs SNPs issus des gènes <i>Aoc</i> (a), <i>Lapx</i> (b), <i>Ccc</i> (c), <i>Ts</i> (d), <i>Nrt1a</i> (e), <i>Sos1</i> (f).....	162-167
Figure n°23: Analyse en composantes principales de l'organisation génétique des espèces secondaires (Hyb) par rapport aux taxons ancestraux utilisés comme individus actifs pour définir les axes principaux pour l'ensemble des gènes candidats étudiés, selon les plans factoriels. (a): axe1(F1)/axe2(F2), (b) : axe1(F1)/axe3(F3) et (c): axe2(F2)/axe3(F3)	169-171
Figure n°24: Analyse en composantes principales de l'organisation génétique des espèces secondaires (Hyb) par rapport aux taxons ancestraux comme accessions actives pour le gène candidat <i>Nrt1a</i> (a) et pour le gène candidat <i>Sos1</i> (b).....	174-175
Figure n°25: Porte-greffes (bigaradiers) faisant partie de la collection du GIFruits à Sbikha.....	206
Figure n°26: Histogrammes montrant la mesure de la ploïdie de quelques porte-greffes des collections.....	213-214
Figure n°27: Arbre de dissimilarités génétiques des porte-greffes des collections tunisiennes et des témoins de Corse.....	220-221
Figure n°28: Les accessions de <i>Citrus volkameriana</i> analysées avec le marqueur microsatellite <i>CI02A09</i>	222
Figure n°29: Fruits produits par des arbres d'origine douteuse de <i>C. volkameriana</i> et <i>C. macrophylla</i>	223

LISTE DES FIGURES ANNEXES

Annexes F.I: Détails de la Figure 14 (chapitre I)

Annexe F.II: Alignement de la protéine relative au gène *Nrt1a* (a) chez les génotypes ancestraux et (b) chez l'échantillon total analysé (taxons de base+ espèces secondaires de référence+ génotypés Tunisiens)

Annexe F.III: Alignement de la protéine relative au gène *Sos1* (a) chez les génotypes ancestraux et (b) chez l'échantillon total analysé (taxons de base+ espèces secondaires de référence+ génotypés Tunisiens)

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau n°1:</u> Présentation des principales aires de culture des agrumes (Superficies cultivées en ha par gouvernorat) (GIFruits, 2010).....	13
<u>Tableau n°2:</u> Une synthèse sur le genre <i>Citrus</i> (Navarro & Krueger, 2007).....	37
<u>Tableau n°3:</u> Caractéristiques des porte-greffes importants d'agrumes (Davies et Albrigo, 1994).....	57
<u>Tableau n°4:</u> Les objectifs communément considérés pour l'amélioration des porte-greffes (Khan & Kender, 2007).....	60
<u>Tableau n° 5:</u> Mécanismes de tolérance à la salinité, organisés par des processus de la plante et leur intérêt pour les trois composantes de tolérance à la salinité (Munns et Tester, 2008).....	70
<u>Tableau n°6:</u> Les variétés d'agrumes de référence (23 accessions) représentant les différents Taxons.....	97
<u>Tableau n°7:</u> Liste des 20 couples d'amorces SSRs utilisés.....	99
<u>Tableau n°8:</u> Liste des 4 paires d'amorces indel mitochondriaux utilisées pour l'analyse des accessions d'agrumes collectées et espèces apparentées	101
<u>Tableau n°9:</u> Nombre d'allèles par locus et taille des fragments amplifiés pour chaque marqueur microsatellite analysé (marquage $\gamma^{33}\text{P}$) sur le germoplasme local (201 accessions).....	110
<u>Tableau n°10:</u> Diversité génétique du germoplasme Tunisien pour les 20 marqueurs SSRs.....	111
<u>Tableau n°11:</u> Diversité génétique des quatre groupes variétaux prospectés en Tunisie.....	112
<u>Tableau n°12:</u> Génotypes uniques, origine et nombre de loci hétérozygotes.....	116
<u>Tableau n°13:</u> Nombre d'allèles par locus et taille des fragments amplifiés pour chaque marqueur microsatellite analysé sur le germoplasme local et les accessions de référence.....	118
<u>Tableau n°14:</u> Les différents loci et allèles différenciant les accessions locales des génotypes de référence.....	126
<u>Tableau n°15:</u> Les génotypes Tunisien issus de l'étude de diversité et faisant l'objet d'analyse de la diversité allélique des gènes candidats pour la tolérance à la salinité.....	134
<u>Tableau n°16:</u> Les génotypes utilisés comme références pour l'analyse de la diversité allélique des gènes candidats pour la tolérance à la salinité.....	135
<u>Tableau n°17:</u> Gènes candidats présélectionnés pour leur étude de diversité allélique.....	138
<u>Tableau n°18:</u> Polymorphisme des séquences nucléotidiques des gènes pour tous les échantillons analysés.....	143
<u>Tableau n°19:</u> Nombre de SNPs spécifiques par gène et par groupe "ancestral".....	144
<u>Tableau n°20:</u> Nombre de loci SNP polymorphes par gène et par groupe d'hybrides et espèces secondaires.....	144

<u>Tableau n°21:</u> Degrés de polymorphisme inter-accession au sein et entre les taxons de base et leurs hybrides avec la fréquence des SNPs chez un seul taxon de base.....	146
<u>Tableau n°22:</u> Résumé statistique de la diversité des marqueurs SNPs.....	147
<u>Tableau n°23:</u> Différenciation génétique des espèces ancestrales par gène et pour l'ensemble des gènes étudiés.....	148
<u>Tableau n°24:</u> Synthèse des diversités nucléotidiques et des différences notées par les paramètres de diversité.....	151
<u>Tableau n°25:</u> Test de neutralité des gènes candidats de tolérance à la salinité pour les trois groupes: population ancestrale (PA), population totale (PT) et population Tunisienne (PTu).....	152
<u>Tableau n°26:</u> Origines phylogénétiques des gènes chez les espèces secondaires et les hybrides des agrumes.....	178
<u>Tableau n°27:</u> Les porte-greffes existant dans les parcs semenciers de Sbikha et d'El Gobba.....	207
<u>Tableau n°28:</u> Les porte-greffes analysés de la collection de l'INRAT - El Gobba.....	208
<u>Tableau n°29:</u> Les porte-greffes témoins de Corse.....	208
<u>Tableau n°30:</u> Les amorces microsatellites utilisées, leurs séquences et températures d'hybridation respectives.....	210
<u>Tableau n°31:</u> Résultats du niveau de ploïdie des porte-greffes des collections.....	213
<u>Tableau n°32:</u> Nombre d'allèles des marqueurs SSRs et gamme de taille des amplicons analysés...	214
<u>Tableau n°33:</u> Récapitulation des situations de non-conformité des porte-greffes analysés.....	217

LISTE DES TABLEAUX ANNEXES

Annexe I: Le germoplasme local Tunisien, représentant différents groupes variétaux d'agrumes, collecté pour les analyses de diversité (201 accessions)

Annexe II: Fréquences alléliques par locus pour chaque groupe variétal, paramètres de polymorphisme et indice de mesure de la différenciation génétique, pour les 20 loci SSRs analysés

Annexe III: Variances sur *Fit*, *Fis* et *Fst* par ré-échantillonnage selon la méthode du Jackknife sur les loci

Annexe IV: Estimations de Weir & Cockerham de *Fit* (CapF), *Fst* (thêta) et *Fis* (smallF), du degré de rapprochement (Relat), du rapprochement de consanguinité corrigé (Relatc) et des composants de la variance entre échantillons (sig_a), entre individus au sein d'un échantillon (sig_b) et à l'intérieur des individus (sig_w)

Annexe V: Richesse allélique par locus par groupe variétal et pour l'ensemble de l'échantillon

Annexe VI: Nombre d'allèles à chaque locus dans chaque échantillon et pour l'ensemble des échantillons

Annexe VII: Estimation de F_{IS} par locus après permutation des allèles à l'intérieur de chaque groupe variétal

La Biodiversité végétale comme mentionnée dans le Saint Coran

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا نُخْرِجُ مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِنْ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِّنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَبِهٍ أَنْظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ إِنَّ فِي ذَٰلِكُمْ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ (سورة الأنعام- الآية 99)

Et c'est Lui qui, du ciel, a fait descendre l'eau. Puis par elle, Nous fîmes germer toute plante, de quoi Nous fîmes sortir une verdure, d'où Nous produisîmes des grains, superposés les uns sur les autres; et du palmier, de sa spathe, des régimes de dattes qui se tendent. Et aussi les jardins de raisins, l'olive et la grenade, semblables ou différents les uns des autres. Regardez leurs fruits au moment de leur production et de leur mûrissement. Voilà bien là des signes pour ceux qui ont la foi (Surat Al-Anaam, 99).

وَهُوَ الَّذِي أَنْشَأَ جَنَّاتٍ مَّعْرُوشَاتٍ وَغَيْرِ مَّعْرُوشَاتٍ وَالنَّخْلَ وَالزَّرْعَ مُخْتَلِفًا أَصْنَافُهُ وَالرُّمَّانَ مُتَشَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَبِهٍ كُلُوا مِن ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَءَاتُوا حَقَّهُ يَوْمَ حَصَادِهِ وَلَا تُسْرِفُوا إِنَّهُ لَا يُحِبُّ الْمُسْرِفِينَ (سورة الأنعام- الآية 141)

C'est lui qui a créé les jardins, treillagés et non treillagés; ainsi que les palmiers et la culture aux récoltes diverses; [de même que] l'olive et la grenade, d'espèces semblables et différentes. Mangez de leurs fruits, quand ils en produisent; et acquittez-en les droits le jour de la récolte. Et ne gaspillez point car Il n'aime pas les gaspilleurs (Surat Al-Anaam, 141).

فَلْيَنْظُرِ الْإِنْسَانُ إِلَى طَعَامِهِ (24) أَنَا صَبَّبْنَا الْمَاءَ صَبًّا (25) ثُمَّ شَقَقْنَا الْأَرْضَ شَقًّا (26) فَأَنْبَتْنَا فِيهَا حَبًّا (27) وَعِنَبًا وَقَضْبًا (28) وَزَيْتُونًا وَنَخْلًا (29) وَحَدَائِقَ غُلْبًا (30) وَفَكْهَةً وَأَبًّا (31) مَّتَاعًا لَّكُمْ وَلِأَعْلَمِكُمْ (32) - (سورة عبس- الآية 24-32)

Que l'homme considère donc sa nourriture (24). C'est Nous qui versons l'eau abondante (25), puis Nous fendons la terre par fissures (26) et y faisons pousser grains (27), vignobles et légumes (28), oliviers et palmiers (29), jardins touffus (30), fruits et herbages (31), pour votre jouissance vous et vos bestiaux (32) (Surat Abasa).

أَلَمْ تَرَ أَنَّ اللَّهَ أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ ثَمَرَاتٍ مُّخْتَلِفًا أَلْوَانُهَا وَمِنَ الْجِبَالِ جُدَدٌ بَيَضٌ وَحُمْرٌ مُّخْتَلِفٌ أَلْوَانُهَا وَغَرَابِيبُ سُودٌ (27) وَمِنَ النَّاسِ وَالْدَّوَابِّ وَالْأَنْعَامِ مُخْتَلِفٌ أَلْوَانُهُ كَذَٰلِكَ إِنَّمَا يَخْشَى اللَّهَ مِنْ عِبَادِهِ الْعُلَمَاءُ إِنَّ اللَّهَ عَزِيزٌ غَفُورٌ (28) (سورة فاطر- الآية 27-28)

N'as-tu pas vu que, du ciel, Allah fait descendre l'eau? Puis Nous en faisons sortir des fruits de couleurs différentes. Et dans les montagnes, il y a des sillons blancs et rouges, de couleurs différentes, et des roches exclusivement noires (27). Il y a pareillement des couleurs différentes, parmi les hommes, les animaux, et les bestiaux. Parmi Ses serviteurs, seuls les savants craignent Allah. Allah est, certes, Puissant et Pardonneur (28) (Surat Fatir).

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La science consiste à passer d'un étonnement à un autre
Aristote

La culture des agrumes représente à l'aube du troisième millénaire, un intérêt économique de premier ordre, sans cesse grandissant, occupant ainsi la première place des productions fruitières mondiales. L'industrie mondiale des jus de fruits est aussi dominée par les jus d'agrumes.

Le bassin méditerranéen est considéré comme la seconde zone de diversification des agrumes et a constitué un tremplin pour l'expansion des espèces agrumicoles cultivées à travers le monde. Ainsi, les pays méditerranéens sont des sources riches en germoplasmes ayant un potentiel considérable pour le développement de variétés nouvelles. L'industrie des agrumes est l'une des composantes principales de l'agriculture méditerranéenne. *Leader* mondial pour les petits agrumes, elle en représente 60% de la totalité du commerce international, un marché en pleine expansion en Europe, aux USA et au Japon. Malheureusement, en dépit de son essor, l'agrumiculture affronte une combinaison complexe de contraintes biotiques, principalement le virus de la tristeza (CTV) et *Phytophthora*, et de stress abiotiques (manque d'eau, salinité, alcalinité), ceci principalement dans les parties Sud et Est du bassin.

La Tunisie connaît les mêmes contraintes que les autres pays de la région. Plus particulièrement, la production des agrumes en Tunisie est tout d'abord confrontée à des contraintes naturelles telles que l'érosion des sols, la faible pluviométrie et sa mauvaise distribution, la salinité croissante des terres ou encore l'aridité du climat. A ces problèmes environnementaux s'ajoutent les pratiques culturales mal adaptées, la mauvaise qualité des eaux d'irrigation ainsi que des contraintes structurelles et socio-économiques. En effet la faible taille des exploitations et les difficultés d'accès au crédit pour 90% des agriculteurs sont parmi les freins majeurs au développement du secteur. Une étude a estimé que l'utilisation d'intrants agricoles ne dépassant guère la moitié des doses recommandées fournit un très bon indicateur de ces contraintes socio-économiques.

Au Cap-Bon, terres de prédilection des agrumes en Tunisie, le programme d'appui au lancement de la variété «Maltaise» en 1997, a globalement porté ses fruits en dépit de l'insuffisance des moyens de lutte contre les maladies, la persistance de techniques culturales obsolètes et le vieillissement perceptible des plantations de la région qui peinent à se renouveler. Depuis 1934, le commerce d'exportation a vécu une grande expansion, notamment avec la production de l'orange phare "la maltaise de Tunisie", qui représente à elle seule, 45% de la production totale des agrumes.

Les cultivars d'agrumes sont propagés végétativement par greffage du bourgeon sur un plant de porte-greffe. En effet, l'utilisation de porte-greffe -pratique généralisée dans les systèmes modernes de production d'agrumes- assure l'uniformité de l'arbre, une production rapide, et une tolérance aux pathogènes comme les *Phytophthora* sp., les nématodes parasites et les viroses. Aussi, les porte-greffes sont susceptibles d'améliorer le rendement et la qualité des fruits en offrant aux arbres des capacités d'adaptation à des conditions pédoclimatiques très variées, et aux différentes contraintes biotiques et abiotiques affectant notamment l'agrumiculture méditerranéenne. Jusqu'à un passé assez récent, la quasi-totalité du verger était greffée sur le bigaradier (*Citrus aurantium* L.), un des porte-greffes d'agrumes les plus utilisés au monde, et encore prédominant sur le bord sud du bassin méditerranéen. Le bigaradier doit son succès à sa tolérance au calcaire, à l'alcalinité et la salinité ainsi que sa résistance à *Phytophthora* sp. Par ailleurs, ce porte-greffe est compatible avec une large gamme de variétés et confère une bonne qualité des fruits. Cependant, sa combinaison avec les variétés commerciales forment des arbres qui sont sensibles au virus de la tristeza (CTV). Il s'agit d'une maladie dévastatrice causant le déclin rapide et la mort des arbres greffés sur bigaradier. Ceci est accentué par la distribution relative du puceron brun des agrumes (*Toxoptera citricida*), vecteur de transmission le plus efficace du CTV. La propagation de cette maladie un peu partout dans le bassin méditerranéen menace sérieusement l'agrumiculture de cette zone et implique la recherche de porte-greffes de substitution pouvant combiner des caractères de résistances aux maladies en premier lieu à la Tristeza, des adaptations aux conditions particulières environnementales et une compatibilité avec la variété greffée.

En Tunisie, qui est un pays encore indemne de la tristeza, le bigaradier est toujours le porte-greffe prédominant de l'agrumiculture. Malgré une propagation clonale (apomixie et multiplication par graines), la variation morphologique présentée par les accessions locales de bigaradier est remarquable. D'autres types de porte-greffes et d'agrumes non greffés sont toujours utilisés, particulièrement dans les oasis; ces arbres sont rattachés aux groupes des orangers, des limettiers et des citronniers. Les porte-greffes traditionnels tunisiens ont montré une bonne adaptation aux conditions défavorables régionales relatives au sol et au climat.

Par ce fait, ces porte-greffes constituent un germoplasme précieux à exploiter comme source de tolérance au stress abiotique pour des projets futurs d'amélioration génétique des porte-greffes. De tels projets requièrent une connaissance de la diversité et des relations génétiques parmi les génotypes constituant ce germoplasme. De telles connaissances, sont essentielles

pour la gestion, la protection et l'exploitation en création variétale de ces ressources génétiques. Aujourd'hui, la diversité génétique des porte-greffes existants sur le territoire national, les mécanismes qui concourent à la structuration dans le temps et dans l'espace, de cette diversité, sont méconnus. Pour cela, les activités de recherche, les enquêtes, les activités de collection, de préservation et de caractérisation du germoplasme local constituent une priorité.

C'est pourquoi nous avons mis en œuvre une étude (Chapitre I) dans un but d'évaluer la diversité des génotypes de porte-greffes représentant les quatre espèces présentes en Tunisie. Cette étude avait pour objectif de dégager le degré de variabilité intra et interspécifique au sein d'un large échantillonnage de bigaradiers tunisiens et à une moindre proportion d'autres espèces utilisées comme porte-greffes : les oranger, les citronniers et les limetiers.

Nous avons utilisée pour ce faire (i) des marqueurs microsatellites (SSR) nucléaires qui présentent l'avantage d'un polymorphisme important, d'une hérédité co-dominante et d'une dispersion sur l'ensemble du génome et (ii) des marqueurs Indels mitochondriaux permettant d'analyser la phylogénie maternelle.

Dans un pays en grande partie aride comme la Tunisie, l'irrigation s'impose comme un choix incontournable pour améliorer la productivité agricole, notamment l'agrumiculture. Plusieurs périmètres irrigués ont été aménagés le plus souvent dans des plaines alluviales, de part et d'autre des cours d'eaux (vallée de la Medjerda), dans les plaines côtières et dans les oasis. Toutefois, l'irrigation à partir des eaux de surface et de celles des barrages conduit souvent à des phénomènes de salinisation des sols. Les facteurs hydrologiques, géomorphologiques et géologiques dans plusieurs zones font que de nombreuses surfaces irriguées sont soumises au régime d'une nappe phréatique non seulement subaffleurante mais aussi salée, ce qui accroît les risques de salinisation secondaire des sols. Une telle salinisation peut entraîner la dégradation et la stérilisation du sol, ce qui se répercute négativement sur les rendements des cultures. En Tunisie, les sols affectés par la salinité couvrent 1,5 million ha, soit environ 10% de la surface totale du pays. L'approche biologique, qui repose principalement sur l'exploration de la variabilité de la réponse au sel des espèces, permettrait d'identifier des plantes tolérantes au stress salin.

Cette démarche a été suivie dans le projet Européen INCO CIBEWU : "*Citrus Breeding for efficient water and nutrient use*" qui a contribué à la mise en œuvre de cette thèse. L'objectif général de ce projet était d'améliorer l'efficacité d'exploitation du germoplasme d'agrumes

pour l'amélioration des porte-greffes. Les recherches de ce projet concernent la tolérance à la salinité d'une part et la déficience ferrique associée aux sols calcaires d'autre part. Des approches physiologiques, génomiques, génétiques et biotechnologiques ont été combinées afin de fournir les connaissances et les méthodologies nécessaires à ces recherches. L'un des volets étudiés concerne la recherche de gènes candidats et l'étude de leur diversité génétique et distribution physique dans le génome ainsi que l'analyse de la relation entre la variabilité des indicateurs physiologiques et la variabilité des gènes candidats pour la tolérance aux stress abiotiques.

Le chapitre II de cette thèse concerne plus précisément l'analyse de la diversité de séquence de six gènes candidats pour la tolérance à la salinité chez les agrumes: porte-greffes et taxons de base. Elle complète les travaux déjà réalisés sur les gènes candidats de tolérance à la salinité, dans le cadre du projet INCO CIBEWU. Ce travail novateur, inclue des génotypes tunisiens les plus remarquables issus du premier travail d'évaluation de la diversité génétique de porte-greffes d'agrumes utilisés en Tunisie. L'objectif général de ce chapitre est d'identifier des polymorphismes de type SNPs (polymorphismes de mutation ponctuelle) au sein de gènes candidats pour la tolérance à la salinité. La mise en parallèle dans le futur, de données phénotypiques et physiologiques, permettra d'établir des corrélations entre la diversité allélique des gènes candidat d'une part, et la variabilité d'indicateur physiologique de tolérance au stress salin, d'autre part.

L'utilisation et la gestion des ressources génétiques des parcs semenciers, des collections, chez le pépiniériste ou chez l'agriculteur, constituent la base de l'amélioration des espèces et des variétés ainsi que de l'assurance qualité dans la production de semences. Une des actions essentielles pour l'amélioration et la durabilité de l'agrumiculture Tunisienne à court terme est donc d'établir un état des lieux national, concernant les porte-greffes d'agrumes en parc semencier ou chez l'agriculteur.

Pour cela, la dernière partie de cette thèse (Chapitre III) s'est proposé d'analyser la conformité génétique des porte-greffes d'agrumes présents dans trois collections (collections du GIFruits et de l'INRAT à El Gobba (Cap-Bon) et collection du GIFruits à Sbikha). Ce travail est en état de fournir la confirmation de l'identité exacte et de l'homogénéité du matériel distribué.

OBJECTIFS

L'imagination est plus importante que la connaissance.

Albert Einstein

Afin d'apporter une contribution à faire face aux enjeux de l'agrumiculture tunisienne, il a été proposé au cours de cette thèse:

1) L'étude de la diversité génétique des porte-greffes d'agrumes utilisés en Tunisie. Lors de cette étude, on essayera d'apporter des éléments de réponse aux questions suivantes:

- comment est organisée la diversité génétique des porte-greffes d'agrumes utilisés en Tunisie?
- quels sont les principaux facteurs expliquant l'organisation de cette diversité génétique? Parmi ces facteurs, quel aurait été le rôle de la sexualité dans la diversification intercultivar au sein de chaque groupe variétal issu d'apomixie facultative?
- Y aura-t-il de sources de diversité spécifiques à la Tunisie, en situant la diversité du germoplasme tunisien dans une diversité plus globale représentée par les génotypes de référence des mêmes groupes variétaux représentant les collections d'agrumes certifiés?

Pour cet objectif, une prospection des porte-greffes d'agrumes dans différentes régions de la Tunisie a été réalisée et a permis la collecte de 201 accessions. Ces dernières ont été analysées, ainsi que les cultivars de référence des banques de germoplasmes espagnole et française, à l'aide de 20 marqueurs microsatellites (SSRs) nucléaires et 4 marqueurs Indel mitochondriaux.

Cette étude de diversité permettra d'identifier un échantillon réduit de génotypes pour mettre en place des évaluations fines des tolérances aux stress biotiques et abiotiques et du comportement agronomique, dans la perspective de les intégrer dans les programmes d'amélioration des porte-greffe d'agrumes pour la Tunisie et à plus grande échelle pour le Bassin Méditerranéen.

2) L'analyse de la diversité allélique des gènes candidats pour la tolérance à la salinité chez les agrumes: porte-greffes et taxons de base représentatifs de la diversité génétique du genre *Citrus*.

Dans le cadre des travaux réalisés par le CIRAD, l'IVIA et l'INRA (Corse) sur la tolérance au stress salin chez les agrumes, plusieurs études entreprenaient de décortiquer les mécanismes

physiologiques et génétiques spécifiques aux génotypes d'agrumes, et pouvant expliquer des comportements de sensibilité/tolérance au stress salin. Ces génotypes d'agrumes étant représentatifs de la diversité génétique du genre *Citrus*. Ce deuxième objectif de la thèse s'inscrit dans le cadre du projet Européen INCO CIBEWU: "*Citrus Breeding for efficient water and nutrient use*" impliquant les trois institutions mentionnées ci-dessus, et fait partie des tâches du *workpackage* 4 (WP4 : *Allelic diversity, genetic mapping and recombination between Citrus and Poncirus*), auquel l'INRAT a contribué. Dans le cadre de ce projet, des gènes candidats de tolérance à la salinité ont été sélectionnés à partir de bases de données EST, afin d'analyser leur expression par microarrays.

Dans ce travail de thèse on s'est donc intéressé à l'étude de la diversité allélique des gènes candidats sur des génotypes représentatifs de la diversité génétique du genre *Citrus*. Ces génotypes sont constitués d'une part par les individus tunisiens les plus remarquables issus du premier travail d'évaluation de la diversité génétique de porte-greffes d'agrumes utilisés en Tunisie (1^{er} objectif de la thèse), et d'autre part par des génotypes de taxon de base des collections d'agrumes certifiés, pris comme référence représentant les mêmes groupes variétaux.

Ce travail aborde 4 objectifs principaux:

- L'analyse des séquences pour les différents génotypes et pour chaque gène.
- L'analyse de la variabilité des séquences qui aboutit à l'identification des mutations ponctuelles (SNPs) interspécifiques sur les séquences des gènes en question.
- La distinction des haplotypes.
- La détermination de l'origine phylogénétique des allèles des espèces secondaires et des génotypes hybrides.

L'étude de la variabilité des séquences de gènes impliqués dans la tolérance au stress salin parmi des génotypes d'agrumes représentatifs de la diversité génétique du genre *Citrus*, est susceptible de contribuer à l'identification de déterminants moléculaires associés à la tolérance au sel. L'implication de génotypes tunisiens remarquables dans cette étude a eu pour objectif de décortiquer la nature des séquences des gènes candidats au sein de ces génotypes, pour la première fois analysés, et de mettre en évidence les corrélations entre les SNPs identifiés et la structuration phylogénétique des génotypes tunisiens parmi les accessions de référence qui détiennent l'origine allélique déterminant le caractère de tolérance à la salinité.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

On ne connaît pas complètement une science tant qu'on n'en sait pas l'histoire.
Auguste Comte

I- Les agrumes - importance économique

1-1- A l'échelle mondiale

La culture des agrumes a pris naissance il y a probablement 4000 ans dans les régions subtropicales du continent asiatique et de l'archipel Malais. Le commerce international des agrumes frais a débuté il y a deux siècles environ. Aujourd'hui cultivés sur plus de 3 millions d'hectares et dans plus de 100 pays aux climats tropicaux, subtropicaux et méditerranéens, les agrumes constituent la principale culture fruitière dans le monde. L'amélioration de la production est principalement due à la croissance des terres cultivées consacrées aux agrumes. Un autre facteur expliquant l'importance de l'agrumiculture à l'échelle mondiale réside dans la valeur thérapeutique des fruits d'agrumes et la conscience de leurs bienfaits pour la santé. La libéralisation du commerce ainsi que les avancées technologiques en matière de stockage et de transport, ont engendré une mondialisation de l'industrie des agrumes. L'industrie mondiale du jus de fruit est aussi dominée par les jus d'agrumes.

La contribution de l'industrie agrumicole à l'économie mondiale est énorme (estimée à plus de 10 milliard de dollars américains par an; Ladaniya, 2008). En terme de volume, la production mondiale des agrumes a énormément augmenté durant les dernières décennies du 20^{ème} siècle, allant d'une moyenne de 48 millions de tonnes par an dans la période 1970-71 à 1978-79, à environ 90 millions de tonnes durant la saison 1999-2000 ou encore 108,535 millions de tonnes en 2004 (www.fao.org).

La production d'agrumes est très répandue autour du globe. Selon les données statistiques de la FAO, en 2004, plus de 140 pays produisaient des agrumes. L'hémisphère nord (surtout les États-Unis et les pays méditerranéens) contribue pour 75% de la production totale, par contre l'hémisphère sud (surtout le Brésil, l'Argentine, l'Australie et l'Afrique du Sud) contribue pour les 25% restants (Dugo et Di Giacomo, 2002). Ces derniers pays augmentent leurs exportations en approvisionnant les marchés du nord en fruits d'agrumes hors-saison. La région méditerranéenne est un grand exportateur d'agrumes frais avec 60% du volume, où l'Espagne joue le rôle du plus grand exportateur avec 25% du total des exportations mondiales. Selon la FAO, la consommation d'oranges frais diminue dans les pays industrialisés et augmente dans les pays en développement et émergents comme le Mexique, l'Inde, la Chine et l'Argentine (Ollitrault et Navarro, 2012).

Bien que la production d'agrumes soit répandue dans le monde, sa majeure partie est concentrée au Brésil (19811,100 tonnes), en Chine (6171,716 tonnes), aux USA (8079,390 tonnes) et aux pays méditerranéens (17173,124 tonnes) (FAO, 2012; Gifruits, 2012). Ces états comptent pour plus des deux tiers de la production totale d'agrumes. La production est dominée par les orangers (Fig. 1). Le Brésil et les États-Unis (Floride et Californie) sont les principaux producteurs d'orange douce. Ils sont les deux pays "leaders" dans le secteur des agrumes transformés. Les États-Unis est le producteur "leader" en pomélos. La Chine, l'Espagne et le Japon produisent 65% des tangerines cultivées dans le monde. Les citrons sont principalement produits en Argentine, en Espagne en Italie et aux États-Unis. Les limes représentent une culture traditionnelle au sud d'Asie et au moyen orient (Khan et Kender, 2007) et constitue une production importante de certains pays latino-américains comme le Mexique.

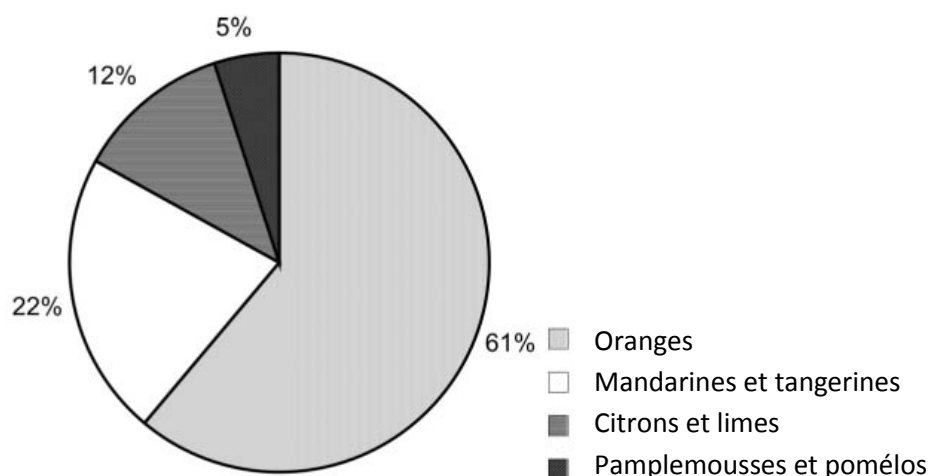


Figure 1. Production des fruits d'agrumes dans le monde

(Khan & Kender, 2007)

1-2- A l'échelle du bassin méditerranéen

La spécificité de l'espace méditerranéen se résume en trois grands indicateurs: l'originalité de son climat et de sa végétation, la valeur de sa biodiversité et de ses paysages et aussi la fragilité de ses territoires face aux contraintes du milieu (sécheresse, érosion hydrique, inondation, salinisation, relief escarpé). L'agrumiculture méditerranéenne est à l'image de l'agriculture méditerranéenne: son trait dominant réside dans sa grande hétérogénéité.

Les pays méditerranéens produisent d'énormes quantités de fruits d'agrumes destinés au marché frais (81% de la production). Les clémentines, mandarines et fruits apparentés du Maroc et d'Espagne dominent la catégorie des fruits faciles à éplucher : "*easy-peelers*".

La région méditerranéenne apporte la plus forte contribution (55%) (FAO, 2004) au marché international des petits agrumes (clémentines et mandarines) qui est en pleine expansion en particulier en Europe.

Elle exporte 2,24 millions de tonnes de tangerines/mandarines/Satsumas sur un total des exportations de 3,13 millions de tonnes de ces types d'agrumes dans le monde durant la période 2004-2005 (FAO, 2006). La production d'oranges de 2010 est estimée à 64 millions de tonnes dont 35,7 millions de tonnes qui serviront au marché frais. La production d'agrumes dans les pays du bassin méditerranéen a atteint un total de 17,1 millions de tonnes durant la campagne 2011-2012 (Gifruits, 2012). Les échanges internationaux d'agrumes sont essentiellement euro-méditerranéens. C'est dire l'importance de cette zone et du rôle central des échanges dans les enjeux de l'agrumiculture méditerranéenne (Ladaniya, 2008).

La région méditerranéenne est le principal exportateur d'agrumes frais, avec 60% du volume global. L'Espagne y a joué, depuis très longtemps, un rôle prépondérant, fournissant presque tous les agrumes expédiés vers le Royaume-Uni, l'Allemagne et la France (25% du total des exportations mondiales).

Les pays de l'hémisphère sud, comme l'Argentine, l'Australie et l'Afrique du sud, accroissent leurs exportations en fournissant des fruits d'agrumes hors-saison au marché nordique. Ceci a été favorisé par les améliorations apportées au niveau du stockage et du transport.

Dans le cas des États-Unis, les premières destinations sont le Japon, le Canada, et les pays du Sud-Est Asiatique. Pour certains pays, entre autre en Asie, l'essentiel de la production est destiné au marché local.

Le marché mondial du jus d'orange utilise principalement des oranges (80%) et compte pour le tiers de la production totale. Deux acteurs principaux: la Floride aux États-Unis et l'État de Sao Paulo au Brésil, approvisionnent environ 85% du marché mondial. La différence principale réside dans le fait que le Brésil exporte 99% de sa production alors que 90% de la production de la Floride est consommée dans les marchés locaux américains. L'Union Européenne étant le plus grand importateur de jus d'orange avec plus de 80% des importations mondiales (source: UNCTAD <http://www.unctad.org/infocomm/anglais/orange/market.htm>).

La production agrumicole tunisienne tient la 9^{ème} position en Méditerranée avec 250.000 tonnes en moyenne/an au cours des dernières années, représentant près de 1.2% de la production méditerranéenne.

1-3- A l'échelle de la Tunisie

Bien que les agrumes ne soient pas natifs de nos contrées, certaines plantations sont parfois très anciennes. A partir du VII^{ème} siècle, les Arabes répandirent la culture des citrons et des bigarades en Afrique du Nord et jusqu'en Espagne...Au XVI^{ème} siècle, quand les Andalous vinrent s'installer en Tunisie, ils apportèrent avec eux un savoir faire de jardiniers passionnés et expérimentés. Un patrimoine formateur d'une main-d'œuvre qualifiée que les générations successives se sont transmis. En Tunisie, la culture industrielle des agrumes s'est établie après l'occupation française avec entre-autres la création du *jardin d'essais* en 1893 puis au début du XX^{ème} siècle. La Tunisie réunit un ensemble de conditions naturelles et économiques favorables à l'extension des agrumes. Après l'indépendance en 1956, les superficies plantées en agrumes ont donc notablement augmenté particulièrement au Cap-Bon. Le manque d'eau a cependant limité cette extension à partir des années 70. Ce n'est qu'avec l'arrivée des eaux du Nord dans les périmètres de sauvegarde du Cap-Bon que la situation s'est améliorée notablement au milieu des années 80 (Mzali et Lasram, 2006). A partir de 1992 une stratégie de développement du secteur des agrumes a été mise en place afin d'augmenter la production et la qualité en vue de satisfaire aussi bien le marché local que celui de l'export. L'apport en eau, l'introduction de nouvelles techniques de culture et de nouvelles variétés d'agrumes et l'extension de l'agrumiculture à de nouvelles zones de production furent autant d'actions entreprises pour consolider le développement et l'avenir de ce secteur. Le GIFruits et le CTA sont parmi les organismes publics qui participent à ces actions.

En Tunisie, l'agrumiculture est plus particulièrement adaptée aux régions côtières et semi-continentales du pays, où les gelées d'hiver susceptibles d'être néfastes aux agrumes sont exceptionnelles. Les principales zones de culture et de production d'agrumes se répartissent un peu partout dans le pays (Tableau 1 et Fig. 2):

- Le Cap Bon qui représente 74% des superficies d'agrumes cultivées demeure la plus importante zone agrumicole, il s'agit notamment des régions de Menzel-Bouzelfa, Nabeul (dont les jardins sont embaumés par les plantes à parfum), Hammamet (centre très important pour la culture du citronnier), Béni Khalled...

- Les environs de Tunis (El Khlidia, Mornag, Ben Arous, Soukra, Péninsule de Sidi Bou Saïd, Manouba...) avec 10% des effectifs
- Région de Bizerte (Ras Djebel, El Alia...) qui représente 4 à 5% des effectifs
- Tout le long de la côte au sud de Bir Bou Regba (Sousse, Mahdia, Monastir, Sfax, Teboulba jusqu'à Djerba, avec 2% des effectifs
- La plaine de Kairouan avec 6% des effectifs
- Dans la région intermédiaire du Nord: Béja (1%), Jendouba (4%)
- De petites plantations dans les oasis

Toutes ces régions agrumicoles plus ou moins importantes et réparties sur tout le pays, se situent dans des zones climatiques et édaphiques très différentes, ce qui laisse supposer l'adaptation et la plasticité des différentes variétés. Malgré l'apparition de nouvelles zones d'extension des agrumes, le Cap Bon demeure la région des agrumes par excellence, fournissant 85% de la production nationale (Fig. 3). Il représente les terres de prédilection des agrumes en Tunisie, avec une production estimée à 215 600 tonnes en 2009 (GiFruits, 2009). La valeur de la production nationale des agrumes est estimée à 125 millions de dinars soit 3% du PNB.

Tableau 1. Présentation des principales aires de culture des agrumes

(Superficies cultivées en ha par gouvernorat)

(GiFruits, 2010)

Gouvernorat	Superficie en ha
Sidi Bouzid	25 à 250
Sousse	
Monastir	
Béja	
Ariana	250 à 500
Jendouba	500 à 1.000
Kairouan	
Bizerte	
Ben Arous	
Nabeul	10.000 à 13.000

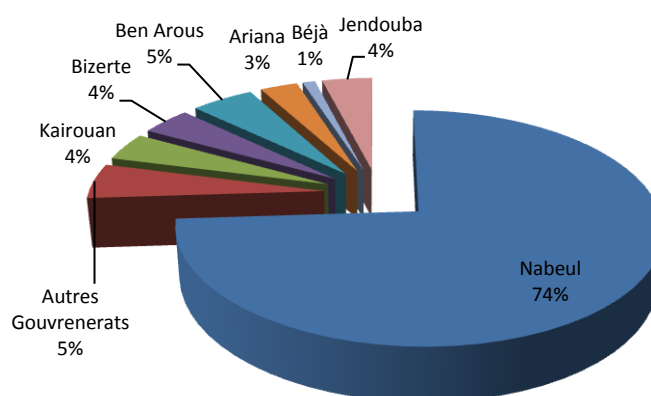
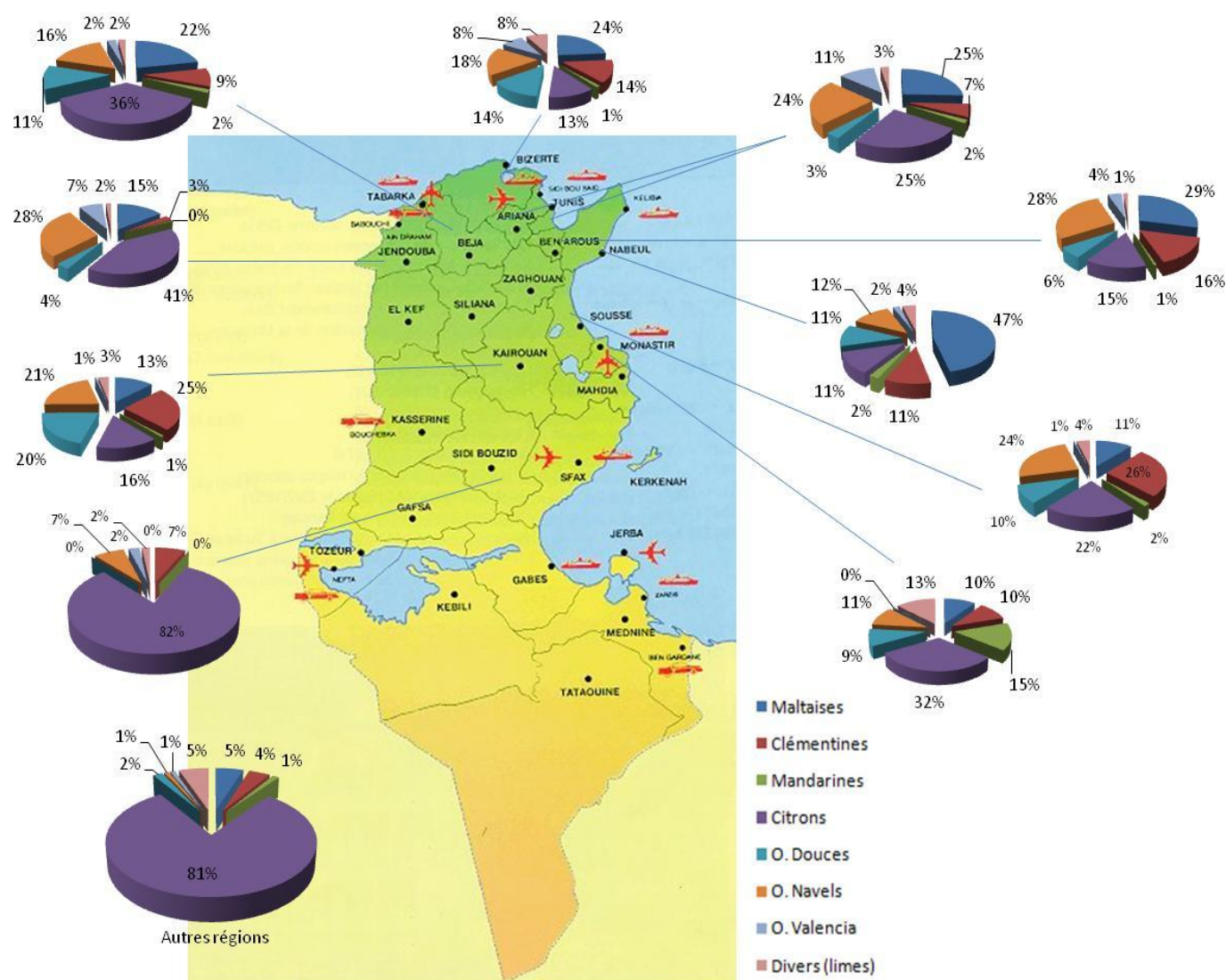


Figure 2. Répartition de l'effectif des superficies d'agrumes cultivées par gouvernorat (en %).



Figures 3. Répartition de la production nationale d'agrumes (en %) selon les espèces durant la campagne 2011/2012

(GIFruits, 2012)

Aujourd'hui la superficie actuelle occupée par les agrumes couvre 22 mille ha, l'équivalent de 0.4% de SAU, avec une production qui oscille entre 210.000 et 300.000 tonnes au cours des dix dernières années (Fig. 4). Le taux de croissance des plantations a atteint les 26% par rapport au recensement de l'année 1999. La production est destinée essentiellement à la consommation en frais. La Tunisie exporte entre 20 et 30.000 tonnes par an, selon les années, avec la 'Maltaise de Tunisie' comme principale variété considérée comme le produit fruitier spécifique de la Tunisie. La branche de production de l'orange maltaise demi-sanguine a présenté à elle seule 50% de la production totale d'agrumes, soit une moyenne de 110 mille tonne au cours du dernier quinquennat.

La valeur des exportations provenant des agrumes est de l'ordre de 14% de la valeur globale des exportations agricoles tunisiennes. La variété maltaise représente à elle seule 94% du total des exportations tunisiennes d'agrumes.

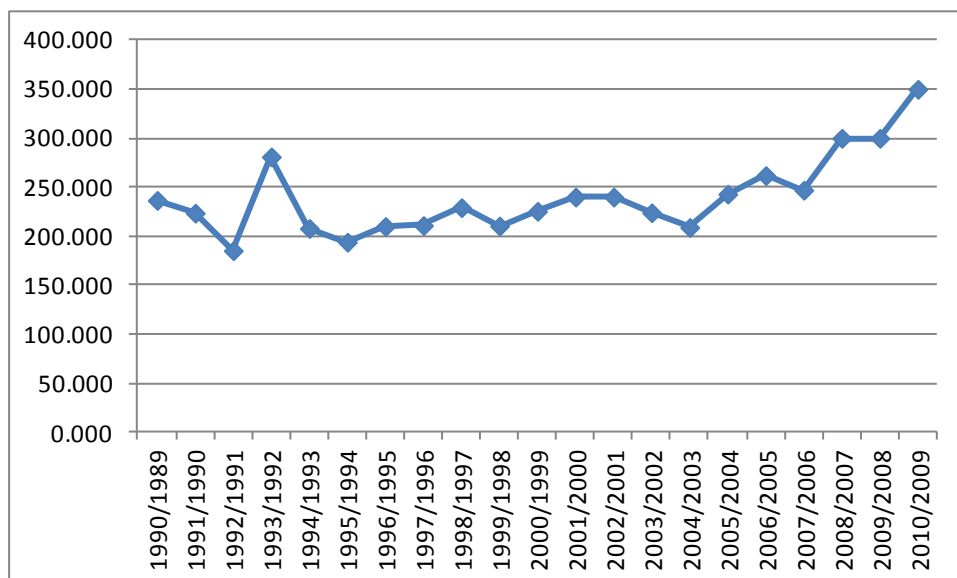


Figure 4. Évolution de la production des agrumes sur les 20 dernières années (GIFruits)

II- Les contraintes de l'agrumiculture méditerranéenne et tunisienne

En dépit de son essor, l'agrumiculture est une filière qui est confrontée à des pressions biotiques et abiotiques croissantes et le risque d'extension dans le Bassin Méditerranéen de maladies émergentes dans les zones chaudes s'est encore accru par la perspective d'un changement climatique global.

En Tunisie, les principales limites se résument dans les conditions climatiques et les disponibilités en eau d'irrigation en quantité et en qualité. Il existe d'autres problèmes dont ceux liés au conditionnement, aux charges d'exploitation ou encore à la dépendance des exportations au marché européen (Zekri et Laajimi, 2001).

2-1- Les contraintes biotiques

La production méditerranéenne d'agrumes est très majoritairement dédiée au marché frais. L'aspect sanitaire des fruits a donc un impact important sur le devenir de la production.

Le bassin méditerranéen est encore indemne de la plupart des maladies importantes, mais les agrumes y sont confrontés à des pathogènes endémiques et à d'autres qui émergent. Au 19^{ème} siècle et début du 20^{ème} siècle les vergers d'agrumes ont été décimés par des maladies telles que le phytophthora et la tristeza provoquée par le CTV. Les infections bactériennes et cryptogamiques se produisant aussi en post-récolte ne sont pas négligeables.

De tous les pathogènes, le virus de la tristeza est parmi les pathogènes les plus importants dans le monde causant des dommages économiques considérables et susceptible de répandre l'infestation à de nouvelles zones (Brlansky *et al.*, 1988). Le CTV a été disséminé dans tous les grands bassins agrumicoles mondiaux par des échanges internationaux de matériel végétal contaminé ou par transmission via plusieurs espèces de pucerons: *Toxoptera citricida* Kirk., le puceron brun des agrumes, étant le vecteur le plus efficace de la maladie (Rocha-Pena *et al.*, 1995). Durant le siècle dernier, plus de 50 millions d'arbres greffés sur bigaradier (*Citrus aurantium* L.) ont été décimés par le CTV, en Argentine, au Brésil, aux Etats-Unis, en Espagne ou au Vénézuéla. Le symptôme le plus foudroyant de la Tristeza étant le Quick Decline, mort brutale affectant orangers et mandariniers greffés sur bigaradier. Le Stem-Pitting est le symptôme cortical typique de la maladie rencontré sur pomélo (*C. paradisi* Macf.) et oranger doux (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), quelque soit le porte-greffe.

2-2- Les contraintes abiotiques

2-2-1- Problème du manque d'eau

Pour permettre leur croissance végétative et leur développement, les plantes ont besoin d'eau en qualité et en quantité appropriées, à portée de leurs racines et au bon moment. Chaque culture a des besoins en eau particuliers, qui varient selon les conditions climatiques locales. A titre indicatif, la production d'un kilogramme de blé ou d'agrumes nécessite environ 1000 litres d'eau, alors que le riz peut en exiger deux fois plus (FAO, 1997).

Les régions sèches dans le monde représentées par les zones arides, semi-arides et désertiques couvrent environ 37% de la surface des continents. Ces territoires s'accroissent d'année en année sous l'effet du réchauffement climatique, lequel, associé à la succession des années de sécheresse ont entraîné la raréfaction des ressources en eau dans ces régions (fig. 5). Selon le scénario actuel sur le changement climatique, près de la moitié de la population de la planète vivra dans des régions soumises à un fort déficit hydrique d'ici 2030.

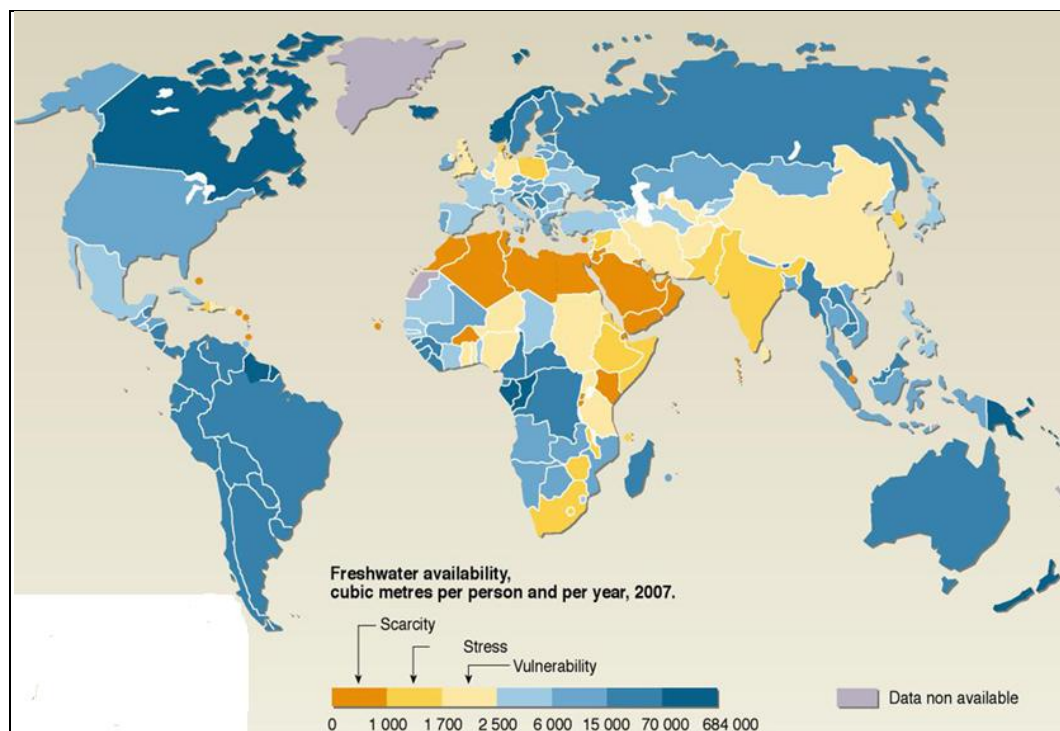


Figure 5. Disponibilité mondiale de l'eau douce en mètre cubique par personne et par an.
(FAO, Nations Unies, Institut des Ressources Mondiales (WRI), 2008)

L'évolution climatique se traduisant par la réduction de 20 à 30% de la capacité de production dans les pays du Maghreb est reliée à une baisse prévue de la pluviométrie et à une augmentation de l'évapotranspiration potentielle (ETP) annuelle (FAO, 2008). Les prévisions réalisées sur 30 à 40 ans sont encore imprécises mais pourraient être de l'ordre de -10% pour la pluviométrie et +10% pour l'ETP (Ben Mechlia, 2009). Compte tenu de la demande évaporative de l'atmosphère qui varie entre 1 et 7 mm/jour, les besoins totaux d'un verger d'agrumes se situent entre 900 et 1200 mm/an. Avec une précipitation de 450 mm en moyenne, les besoins en irrigation varient entre 450 et 700 mm/an. En Tunisie, presque tous les vergers d'agrumes sont menés en irrigué. Pour l'ensemble des agrumes du cap Bon, les besoins en eau d'irrigation se situent entre 64,4 et 100,1 Mm³/an répartis sur la période d'Avril à Octobre, soit entre 21 et 33% de la ressource hydrique totale renouvelable. La distribution de l'eau du réseau public (canal Medjerda/ Cap Bon, eaux du nord, barrages, lacs et barrages collinaires) est réalisée à la demande. À titre d'exemple, le volume d'eau moyen utilisé pour l'irrigation des agrumes dans le gouvernorat de Nabeul est actuellement de 56 Mm³/an pour un volume annuel mobilisable de 90 Mm³. Seulement, la disponibilité de cette eau reste limitée par un débit de fourniture insuffisant en période de pointe (260000 m³/j pour un besoin de 310000 m³/j). Les débits d'eau ne couvrent donc pas les besoins, ce qui a poussé les exploitants à

l'utilisation des nappes phréatiques. Un modèle bio décisionnel relatif au pilotage de l'irrigation des agrumes dans le Cap Bon a montré que les exploitants n'ont pas tous la même perception du bilan hydrique ce qui engendre des volumes d'eau apportés fluctuants et différents des besoins en eau réels (Berdaguer, 2009). Une gestion concertée doit être mise en place, passant par l'établissement de quotas modulables en fonction de la ressource des nappes, des besoins des agriculteurs et de l'attribution d'eau provenant du réseau public.

2-2-2- Sols calcaires

Parmi les contraintes abiotiques, la salinité et les sols calcaires sont les problèmes majeurs du bassin méditerranéen. Par conséquent, la tolérance du porte-greffe au calcaire et à la salinité constitue un impératif fondamental.

La Tunisie septentrionale se distingue entre autre par des sols calcaires profonds. La Tunisie centrale est aussi dominée par les sols encroûtés calcaires squelettiques des grands glacis. Les sols carbonatés (calcimagnésiques) du nord et du centre-ouest épousent régulièrement une roche-mère calcaire, dont l'épaisseur est variable selon la morphologie générale et renferment des horizons encroûtés ou des éléments grossiers calcaires (SID, 2009). Environ 25 à 30 % de la surface du sol du globe terrestre est calcaire, et beaucoup de plantes, parmi lesquelles les agrumes se développent dans ces sols et souffrent d'une déficience en fer (Loeppert, 1986). Les porte-greffes tolérants à la déficience en fer dans les sols calcaires sont généralement utilisés dans ce cas. Les porte-greffes d'agrumes varient dans leur tolérance à la chlorose ferrique, à partir des oranges trifoliées sensibles jusqu'aux espèces d'agrumes les plus tolérants comme les orangers amers ou "Bigaradiers", les mandariniers (*C. reticulata*, *C. nobilis*; *C. depressa*; *C. amblycarpa*), les limettiers Rangpur (*C. limonia*) et *C. macrophylla*, et les citronniers Rough lemon (*C. jambhiri*) et *C. volkameriana*. Les oranges doux (*C. sinensis*) et les hybrides trifoliés, comme les citranges et les citrumellos, ont une tolérance faible à moyenne à la chlorose (Ollitraut *et al.*, 1999). Ces caractéristiques relatives à chaque porte-greffe permettront de nous faciliter la tâche quant au choix du porte-greffe à utiliser dans nos contrées.

2-2-3- Salinité des sols et des eaux d'irrigation

Le phénomène de salinisation "primaire" peut être dû à plusieurs mécanismes. Il se produit naturellement suite à l'effritement des roches mères du sol qui libère une grande quantité de sels solubles de plusieurs types, principalement les chlorures de sodium, le calcium et le magnésium et à moindre degré, les sulfates et les carbonates (Szabolcs, 1989), ou lorsqu'une

nappe phréatique saline se trouve proche de la surface du sol (inférieure à 2 mètres de profondeur). Dans les régions arides et semi-arides, les faibles précipitations sont insuffisantes pour éliminer les excès de sels solubles du sol et le drainage est restreint. La salinisation primaire peut également toucher les zones côtières par intrusion d'eau de mer ou par embruns. La salinisation primaire représente 80% des terres salinisées. 20% des terres salinisées ont une origine "anthropique". On parle alors de salinisation "secondaire", induite par l'activité de l'homme, liée aux pratiques agricoles, en particulier l'irrigation. Elle se produit lorsque l'irrigation est réalisée avec une eau chargée et associée à un mauvais drainage et/ou un bilan hydrique négatif. Cela est particulièrement le cas dans les régions semi arides et arides où les rares pluies ne permettent pas un lessivage des sels (Levigneron *et al.*, 1995; Orzepowski et Pulikowski, 2008).

L'irrigation est une pratique en pleine extension au niveau mondial: environ 8,1 Mha étaient irrigués en 1800 et plus de 222 Mha le sont aujourd'hui. Cette pratique, en offrant des rendements accrus et la possibilité de plusieurs récoltes par an, permet d'assurer 40% de la production vivrière mondiale (Ruellan *et al.*, 2008). Cependant, plusieurs menaces planent sur ce succès et 21% des terres irriguées souffrent d'engorgement, de salinité et/ou d'alcalinisation qui réduisent leurs rendements. Selon la FAO (2008), des 230 million d'hectares de terres irriguées, 45 million d'hectares (20%) sont affectés par la salinité, particulièrement dans les zones arides et semi-arides.

Un sol salin peut être défini comme étant un sol ayant une conductivité électrique de l'eau extraite d'un échantillon de sol saturé (ECe) de 4 dS m^{-1} ($4 \text{ dS m}^{-1} \approx 40 \text{ mM NaCl}$) ou plus (USDA-ARS, 2008) et générant une pression osmotique d'approximativement 0,2 MPa.

Le stress salin impose à l'agriculture une menace environnementale majeure et ses répercussions néfastes deviennent des problèmes plus graves dans les régions où l'eau salée est utilisée pour l'irrigation (Türkan et Demiral, 2009). La salinité est un des principaux facteurs environnementaux affectant la croissance et la productivité des plantes cultivées (Munns, 2002). Globalement le monde perd en moyenne 10 hectares de terres cultivables par minute dont 3 ha à cause de la salinisation. Aujourd'hui, sur la base des données de la FAO, plus de 800 million d'hectares de terres à travers le monde sont affectés par le sel (FAO, 2008), soit plus de 6% de la surface globale mondiale des terres (Munns et Tester, 2008). La région méditerranéenne se trouve au premier rang des zones affectées par la salinisation. A titre d'exemple, en Espagne, qui est le second pays grand producteur de citrons dans le monde,

80% de la production de citrons est située dans les zones arides du Sud-Est, où l'eau d'irrigation est souvent très chargée en sel. Aujourd'hui en Espagne, près de 2,4 million d'ha présentent des symptômes de salinité (histosols), des sols arides avec des gypses salins et autres types de sols pour lesquels la salinité est due à un processus de salinisation secondaire (Mashali *et al.*, 2005).

En Tunisie, la salinité affecte 11,6% (1.8 Mha) de la surface totale des sols (1,3 Mha dus à des causes naturelles et 0,5 Mha dus aux activités humaines) et 25% des surfaces irriguées. (Mashali *et al.*, 2005). Les eaux d'irrigation sont relativement salées (1.5 à 4 g/l) mais le degré de salinisation des sols irrigués n'atteint généralement pas un niveau alarmant grâce au lessivage par l'eau d'irrigation et par les précipitations, et à l'intensification encore réduite des périmètres considérés à fort risque de salinisation. Ces derniers, couvrant 23% des superficies aménagées, font l'objet d'un suivi régulier de la salinité et de la piézométrie, notamment pour les terres pouvant être affectées par le rehaussement des nappes phréatiques (FAO, 2005). L'augmentation de la superficie irriguée est liée à une mobilisation accrue des ressources en eau souterraines (Abdedayem et Boukchina, 2008). Particulièrement dans les régions du centre et du sud du pays, les pratiques d'irrigation affectent les sols, à titre d'exemple, dans la région de Kairouan 50% des terres irriguées sont affectées par le sel. 70% des ressources en eau et 55% des eaux souterraines sont utilisées pour l'irrigation. 30% de ces eaux d'irrigation contiennent plus de 3 g/l de sel. Dans la zone agrumicole du Cap Bon et selon le CRDA de Nabeul (CRDA, 2008), les aquifères ont un taux d'exploitation pouvant atteindre 300%, induisant le tarissement des puits et l'augmentation de leur salinité (dépassant parfois 6,5 g/l), ce qui, à long terme, pourrait engendrer une évolution de la salinité des sols (Berdaguer, 2009). Globalement la Tunisie manque d'eau de qualité ce qui constitue une contrainte à l'extension de la culture des agrumes.

Pour la région méditerranéenne, les porte-greffes nouvellement sélectionnés devront donc être tolérants vis-à-vis du virus de la tristeza mais également vis-à-vis de trois autres stress: l'augmentation de la salinité des sols liée à l'irrigation, le manque d'eau et les carences en fer dues à la nature calcaire des sols.

2-2-4- Réchauffement climatique

Le réchauffement climatique, phénomène d'élévation durable des températures des océans et de l'atmosphère à l'échelle mondiale, constitue la principale forme de changement climatique. Les mesures terrestres de température réalisées au cours du XX^e siècle montrent une élévation de la température moyenne (fig. 2). Ce réchauffement se serait déroulé, au cours du XX^e siècle, en deux phases, la première de 1910 à 1945, la seconde de 1976 à aujourd'hui.

La compréhension scientifique du climat montre désormais sans équivoques que le changement climatique lié au réchauffement global est déjà en cours. Selon la communauté scientifique, ce changement est attribué aux activités humaines des 100 dernières années (Pachauri et Resinger, 2007). Le réchauffement de la planète dû à un effet de serre accentué par les rejets de gaz à effets de serre est intimement lié aux émissions de CO₂ par combustion des matières carbonées fossiles. Bien que ce phénomène de réchauffement de la planète est reconnu par la majorité des scientifiques, de grandes incertitudes subsistent quant à l'ampleur, à la nature et au rythme des phénomènes qu'il va provoquer, ainsi qu'à leurs impacts sur les écosystèmes naturels et l'agriculture : élévation de la température, modification du régime des précipitations, instabilité et accidents climatiques, mais aussi l'effet positif de l'augmentation du taux atmosphérique du gaz carbonique sur la croissance de la végétation (Paillotin *et al.*, 1999). Cependant, on estime que dans certains pays, les rendements des productions non irriguées pourraient être réduits de plus de 50 % en 2020.

La Tunisie est un pays aride et soumis à d'importants défis liés au changement climatique particulièrement sur les zones côtières où est localisée la majorité de la population et des activités économiques. Les études récentes ont montré que l'agriculture de ces zones, ainsi que l'industrie et le tourisme sont de plus en plus vulnérables à l'élévation accélérée du niveau de la mer. Cette élévation va avoir des impacts sur les infrastructures côtières, les terres agricoles, et aussi sur les ressources en eau, particulièrement en terme de qualité.

2-2-5 contraintes structurelles et économiques

Au sud de la Méditerranée, le morcellement des terres prend des significations nouvelles. Il s'agit de menace voire de danger à cause d'une pression foncière croissante sous l'effet de la pression démographique et à la diversification des usages de la terre (Jouve, 2001). Le nombre des exploitations et/ou la superficie cultivée augmentent; la surface moyenne des exploitations est faible voire très faible et les plus petites d'entre elles occupent une part

importante de la surface agricole utile. Favorisé par le jeu des règles juridiques qui régissent l'héritage, par l'urbanisation et par le développement d'autres usages de la terre, le morcellement du foncier, que l'on soupçonne de constituer un lourd handicap pour la modernisation agricole et en particulier agrumicole, se poursuit sur un rythme rapide (Hervieu, 2001). La Tunisie, comme d'autres pays méditerranéens (Turquie, Espagne), connaît une persistance voire une augmentation de l'importance des petites exploitations agricoles (taille inférieure à 5 ha), réel frein pour l'intensification. Elles représentent 53% des exploitations, mais seulement 9% de la SAU, avec une taille moyenne en baisse (11,2 ha) (Abaab et Elloumi, 2001).

Malgré l'évolution du rendement de 7,5 t/ha en 1996 à 16 t/ha en 1997 (Zekri et Laajimi, 2001) et à 18,56 t/ha en 2008 (Boulaâba, 2009), la productivité du verger agrumicole reste encore en deçà du niveau souhaité de 30 t/ha. Un examen de la gestion de plusieurs Commissariats régionaux au développement agricole, a révélé la faiblesse du débit des eaux du nord mises à la disposition des cultivateurs du Cap Bon, principale zone de production, et ce en raison de la capacité limitée du pompage. De même, l'épuisement sensible de la nappe phréatique, l'augmentation du taux de salinité et l'irrigation selon les techniques traditionnelles ne favorisent pas l'amélioration du rendement des agrumes en quantité et en qualité. Or ce dernier point est fondamental dans un objectif de promotion de l'export plus précisément vers les pays de l'Union européenne. A ce sujet, la production de la Maltaise doit être encouragée d'avantage afin d'améliorer sa rentabilité et de préserver son image de produit d'exportation dans un environnement commercial de plus en plus concurrentiel.

Par ailleurs, l'insuffisance flagrante de la main-d'œuvre a impacté, d'une manière négative, la part des pieds régulièrement soumis à la taille. Au fait, outre leur coût élevé, ces opérations, sont toujours heurtées au rejet des jeunes des métiers manuels et des activités professionnelles épisodiques. De même, la taille réduite des plantations, l'âge avancé des agriculteurs et certains problèmes fonciers, relatifs généralement à l'héritage, ont participé au caractère limité des opérations de rajeunissement des domaines agrumicoles, dont l'implantation de jeunes arbres n'a pas dépassé 30 mille unités en 2007, sur un total de 1,8 million de vieux pieds (Boulaâba, 2009). Le taux de réalisation de l'arrachage des vieilles plantations n'a pas dépassé les 10%, et ce du fait aussi de la suppression des aides incitatives. Ce problème concerne essentiellement les petits agriculteurs qui tirent la majeure partie de leurs revenus des agrumes et qui en cas d'arrachage, n'auront pas suffisamment de ressources pour subvenir à leurs besoins en attendant que les nouvelles plantations entrent en pleine production. Une

étude a montré que les marges brutes par hectare varient considérablement d'une variété à une autre indiquant un manque à gagner important (Zekri et Laajimi, 2001). Ce manque à gagner ne peut être résolu qu'avec les investissements qui pourront répondre aux contraintes structurelles à l'amélioration de la rentabilité déjà citées.

Toutefois, la part des investissements affectés à l'agriculture, entre autre au sous-secteur agrumicole, a diminué et reste toujours insuffisant par rapport aux besoins des agriculteurs (Boughanmi, 1995). De plus, les rigidités caractérisant le processus d'octroi des crédits bancaires ainsi que les coûts élevés du capital et du travail engendrent une lenteur dans les investissements et une répulsion de la part des agriculteurs.

III- Biologie et évolution des agrumes

3-1- Taxonomie

Les agrumes (citrus en anglais) regroupent les espèces des trois genres botaniques : *Citrus*, *Poncirus* et *Fortunella*. Le mot "agrumes" s'applique aussi bien aux arbres qu'à leurs fruits.

Selon le système d'Engler, le règne végétal possède treize divisions. Le treizième (Embryophyta Siphonogama) correspond au Spermathophyta. Les rangs taxonomiques inférieurs sont les suivants :

Sous-division : *Angiospermae*

Classe : *Monocotyledoneae*

Ordre : *Geraniales*

Famille : *Rutaceae*

Sous-famille : *Aurantioideae*

Au sein de la famille des Rutacées existent d'autres sous-familles ; celle des *Aurantioideae* englobe tous les agrumes (Ortiz, 2002). Elle inclut deux tribus : *Clauseneae* avec cinq genres et *Citreae* avec 28 genres y compris le genre *Citrus* et les cinq genres apparentés : *Fortunella*, *Poncirus*, *Eremocitrus* (lime du désert), *Microcitrus* (lime sauvage d'Australie) et *Clymenia*. La taxonomie du genre *Citrus* est sujette à controverse puisque deux grandes classifications existent. Tanaka (1961) identifie 156 espèces tandis que Swingle et Reece (1967) n'en distinguent que 16. En effet, Tanaka élève au rang d'espèces de nombreux hybrides intra- ou interspécifiques se multipliant de façon conforme par semis du fait de la polyembryonie :

chaque espèce perpétue ses caractéristiques originales au moyen d'un mécanisme biologique (apogamie ou embryonie nucellaire) qui permet aux plantes de produire des embryons dans les graines sans fécondation. Ces embryons dérivent des cellules du plant-mère et lui sont identiques (Calabrese, 2002).

De point de vue agronomique, les agrumes sont groupés comme suit :

- *C. aurantifolia* (Christm.) Swing. : les limettiers
- *C. aurantium* L. : les bigaradiers
- *C. limon* (L.) Burm.f. : les citronniers
- *C. grandis* (L.) osbeck : les pamplemoussiers
- *C. medica* L. : les cédratiers
- *C. paradisi* Macf. : les pomélos
- *C. reticulata* Blanco : les mandariniers
- *C. sinensis* (L.) osb. : les orangers

Le genre *Fortunella* comprend 2 (Hodgson, 1967) à 4 (Swingle, 1967) espèces. Caractérisées par de petits fruits, les variétés de ce genre sont désignées sous le nom commun de Kumquats qui servent essentiellement à la fabrication des fruits confis. Le genre *Poncirus* a longtemps été considéré comme monospécifique : *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Toutefois Ding *et al.* (1984) ont décrit une nouvelle espèce : *Poncirus polyandra*. L'arbre est épineux à feuilles caduques et trifoliées. Il se distingue par une grande résistance au froid. Ses fruits ne sont pas comestibles et le poncirus est utilisé comme porte-greffe pour les agrumes cultivés ainsi qu'en tant que parent dans les programmes d'amélioration génétique des porte-greffes d'agrumes.

3-2- Biologie de la reproduction chez les agrumes

Les fleurs des agrumes sont hermaphrodites. Chez les agrumes, la fécondation est généralement effectuée par les insectes, et se produit soit par autopolinisation ou par pollinisation croisée (Ortiz, 2002).

La compatibilité sexuelle est complète au sein du genre *Citrus*. Elle est également très large au niveau inter-générique, malgré la très grande diversité du pool primaire (*Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella*). Les premiers hybrides intergénériques entre *Citrus* et *Poncirus* et *Citrus* et *Fortunella* ont été réalisés par l'USDA dès 1897. Depuis, plusieurs travaux ont démontré la

grande compatibilité sexuelle entre *Citrus*, *Fortunella*, *Poncirus* et même avec certains genres plus éloignés (*Eremocitrus* et *Microcitrus*) (Barrett, 1977,1982; Iwamasa *et al.*, 1988). Il a été rapporté que les agrumes et ces deux derniers genres originaires d'Australie constituent un complexe d'espèces tel que l'a défini Pernes (1984). Des hybridations avec des genres plus éloignés ont également été réalisées. Toutefois, ces hybrides intergénériques se sont révélés fortement stériles (Iwamasa *et al.*, 1988), leur utilisation efficace par voie sexuée est prohibée. Les agrumes présentent aussi une incompatibilité sexuelle avec d'autres genres comme ceux de la sous-tribue des *Citrinae* (*Citropsis*) ; les hybridations sexuées entre les agrumes et ces genres ont produit des graines incapables de germer (Nito et Akihama, 1990).

3-2-1- Embryonie nucellaire et apomixie

Chez les plantes à fleurs, l'apomixie (du préf. apo= privatif et du grec mixis= union), qui est le mode de reproduction via les graines formées asexuellement (Asker et Jerling, 1992; Savidan, 2000), est définie comme agamospermie, qui est à son tour divisée en embryonie adventive et apomixie gamétophytique (Batygina et Vinogradova, 2007). L'embryonie adventive est la formation des embryons somatiques à partir de tissus ovulaires en dehors du sac embryonnaire méiotiquement formé (Crane, 2001). L'embryonie adventive peut aussi être divisée en embryonie nucellaire ou inter-tégumentaire selon l'endroit d'où résultent les embryons. Selon Naumova (1993), les embryons adventifs proviennent toujours de cellules uniques appelées embryocytes qui peuvent se différencier dans le nucelle ou les téguments, avant ou après la fécondation du sac embryonnaire. La formation de graine viable à partir d'embryons nuceilaires exige la fécondation des noyaux polaires et le développement ultérieur de l'endosperme. L'initiation des embryons nuceilaires est indépendante de la fécondation.

Une des caractéristiques chez les agrumes est la polyembryonie nucellaire, exception faite des cédratiers, pamplemoussiers, clémentiniers et quelques mandariniers hybrides qui sont monoembryonnés. Chez les autres espèces et variétés, les graines contiennent plusieurs embryons d'origine diverse : les embryons surnuméraires (nucellaire) issus du processus apomictique en compétition avec l'embryon zygotique issu de fécondation normale des ovules (Van Dijk et Van Damme, 2000). Le pourcentage de plants nuceilaires peut varier de zéro pour les espèces monoembryonnées comme le pamplemoussier et d'autres cultivars comme le clémentinier, à pratiquement 100% pour les mandarines "Dancy" et "Kara" (Davies et Albrigo, 1994). Les embryons apogamiques sont uniformes et identiques à la plante-mère

d'origine. Pour cela, l'embryonie nucellaire peut avoir des implications importantes pour les programmes d'amélioration génétique en constituant un obstacle à l'obtention d'hybrides.

L'apomixie a, en revanche, un potentiel très important pour contribuer à la multiplication et à la dissémination des variétés améliorées (Toenniessen, 2001). Chez les agrumes elle permet la multiplication conforme par semis des porte-greffes. De plus, les arbres nucellaires sont généralement indemnes de virus car la plupart des virus et viroïdes ne sont pas transmis à l'embryon. Pour l'amélioration des porte-greffes, la sélection de génotypes avec des pourcentages élevés d'embryons nucellaires est donc essentielle pour la production de porte-greffes uniformes et conformes au plant-mère.

Dans certains cas il est difficile de séparer visuellement les embryons nucellaires des zygotiques. Xiang et Roose (1988) ont comparé le degré relatif d'embryonie nucellaire chez 12 porte-greffes d'agrumes en se basant sur l'analyse isoenzymatique. Les plants nucellaires étaient plus vigoureux que les zygotiques. Un critère qui demeure insuffisant pour une sélection au sein de populations de plants jeunes. Parmi dix accessions de porte-greffes le taux d'embryonie nucellaire variait de 49,4 pour citrange "Yuma" à 94,5 pour rough lemon "Indio". L'analyse du contrôle génétique de l'apomixie chez les genres *Citrus* et *Poncirus* a été réalisée par différents auteurs (García *et al.*, 1999; Asins *et al.*, 2002; Kepiro et Roose, 2010; Aleza *et al.*, 2011).

3-2-2- Stérilité gamétique, autoincompatibilité et parthénocarpie

La stérilité gamétique peut être divisée en stérilité mâle et stérilité femelle. La stérilité mâle (pollinique) est très souvent présente à des degrés variables chez les cultivars d'agrumes. Les accessions mâle-stérile ou auto-incompatibles peuvent produire des fruits sans pépins en absence de pollinisation croisée. Les plus connues des stérilités mâles sont celles de l'oranger Washington Navel et des mandariniers Satsuma. De plus, une faible proportion de pollen viable (5 à 15%) est retrouvée chez de nombreux cultivars comme les pomelo Marsh et Thompson et le citronnier Eureka.

La stérilité femelle est observée chez les mandariniers Satsuma comme chez les orangers Washington Navel, Hamlin, Valencia et le Pomelo Marsh. Yamamoto *et al.* (1995) ont proposé que le degré de fertilité/stérilité femelle doit être évalué sur la base du nombre moyen de pépins par fruit obtenu par pollinisation manuelle.

Les stérilités mâle et femelle sont dues à des facteurs génétiques différents comme les gènes de stérilité, les anomalies chromosomiques (inversion, translocation) et la triploïdie (Ollitrault *et al.*, 2007a). Dans l'objectif de développer de nouveaux cultivars aspermes, des analyses génétiques de stérilité mâle (Ueno, 1986; Matsumoto *et al.*, 1991; Nakano *et al.*, 2000, 2001) et femelle (Nesumi *et al.*, 2000, 2001 ; Omura *et al.*, 2000) ont été réalisées. Auto et inter-incompatibilité sont aussi présentes chez les agrumes. A titre d'exemple, tous les pamplemoussiers sont auto-incompatibles ainsi que d'autres hybrides comme les tangelos Orlando et Minneola, le clémentinier (Soost, 1969). Chez les agrumes, l'auto-incompatibilité est de type gamétophytique (Vardi *et al.*, 2000).

La production de fruits sans pépins ou parthénocarpie (capacité de produire des fruits sans fécondation d'ovule) est possible chez certaines variétés. La parthénocarpie est un trait indispensable pour la production de fruit asperme, et elle est largement présente au sein du germoplasme du genre *Citrus*. La parthénocarpie autonome (production de fruit asperme sans aucune stimulation externe (pollinisation)) est le type de parthénocarpie principal chez les agrumes comme les orangers Navels et les mandarines Satsumas. Il a été rapporté que la parthénocarpie de ces dernières dépend de trois gènes dominants complémentaires (Vardi *et al.*, 2000).

3-3- Ploïdie

Chez tous les agrumes et genres apparentés le nombre de chromosomes de base est $n = 9$ (Krug, 1943). La grande majorité des agrumes est diploïde et leur génome est relativement petit (entre 0,73 et 0,82 picogramme d'ADN par génome diploïde), correspondant à un génome de 714 Mb et 802 Mb (Ollitrault *et al.*, 1999). Quelques exceptions sont des polyploïdes naturels comme la lime Tahiti (*Citrus latifolia* Tan. triploïde), le kumquat de Hong Kong (*Fortunella hindsii* Swing. tétraploïde), des variétés de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. tétraploïdes (Iwasaki, 1943), *Clausena excavata* Burm. F. allotétraploïde (Froelicher *et al.*, 2000), *Clausena harmandiana* Pierre (Guill) tétraploïde, *Glycosmis pentaphylla* Retz. (Corrêa) hexaploïde (Froelicher, 1999), ainsi que d'autres exemples parmi les quelques polyploïdes naturels trouvés chez les *Aurantioideae* (Ollitrault *et al.*, 2008). Bien que les agrumes polyploïdes soient rare au sein du germoplasme il apparaît que les évènements de polyploïdisation naturelles produisant des triploïdes ou des tétraploïdes dans les semis de génotypes diploïdes soit relativement fréquents (Ollitrault *et al.*, 2008).

Des études cytogénétiques ont montré que les hybrides triploïdes résultent de la fécondation d'ovules non réduits par du pollen haploïde (Esen *et al.*, 1979 ; Wakana *et al.*, 1981). Les taux de formation des triploïdes spontanés varient parmi les cultivars. Ils sont de l'ordre de 1 à 7% pour la clémentine et la mandarine King (Geraci *et al.*, 1975) et de 14,6% pour le mandarinier "Wilking" (Soost, 1987). Le taux de 2n gamètes est également élevé chez le mandarinier 'Fortune' pour lequel il a été démontré que le mécanisme l'origine des 2n gamètes était la restitution de la seconde division de la méiose (SDR ; Cuenca *et al.*, 2011). Ces triploïdes sont exploités directement par différents programmes d'amélioration des petits agrumes (Ollitrault *et al.*, 2008 ; Aleza *et al.*, 2010a).

Des évènements de tétraploïdisation semblent se produire relativement fréquemment chez les génotypes polyembryonnés des agrumes. La duplication du stock chromosomique au sein des cellules nucellaires semble être la règle générale pour la génération de ces tétraploïdes (Cameron et Frost, 1968; Aleza *et al.*, 2011). Des allotétraploïdes issus de croisements $2n \times 4n$ ont également été observés (Esen et Soost, 1972).

Ces tétraploïdes sont utilisés comme géniteurs en croisement avec des diploïdes pour la production de variétés triploïdes aspermes (Ollitrault *et al.*, 2008; Aleza *et al.* 2012a). Ils pourraient également présenter de l'intérêt en tant que porte-greffe compte tenu de leur plus grande tolérance à certain stress abiotiques. Suite à une étude récente, on dispose actuellement d'une méthodologie efficace qui permet d'obtenir des hybrides triploïdes à partir d'hybridations $4x \times 2x$ basée sur le sauvetage d'embryon *in vitro* et la détermination du degré de ploïdie par cytométrie en flux (Aleza *et al.*, 2012b).

Malgré les fréquences relativement élevées des évènements de polyploïdisation naturelle, la polyploïdie semble avoir joué un rôle mineur dans l'évolution des agrumes. Ceci pourrait s'expliquer par la plus faible vigueur et la baisse de la fertilité de la plupart des diploïdes doublés et la quasi impossibilité pour les embryons triploïdes de germer en condition naturelles. De plus, les diploïdes doublés ont généralement de faibles rendements, une écorce du fruit épaisse et une pulpe rugueuse, ce qui a favorisé un manque d'intérêt pour la consommation humaine et une contre sélection naturelle et humaine importantes des plantes diploïdes doublés nucellaires (Ollitrault *et al.*, 2007a). Par ailleurs Aleza *et al.* (2011) ont montré que les températures plus faibles des zones de culture marginale des agrumes (comme le nord du Bassin Méditerranéen) augmentaient considérablement la fréquence des

événements de tétraploïdisation. Il est donc probable que ces événements aient été beaucoup moins fréquents dans l'aire d'origine des agrumes.

3-4- Origine et Histoire des agrumes cultivés

Tous les auteurs s'accordent sur le fait que le pool génétique original des agrumes a pris naissance au Sud-Est asiatique il y a plusieurs millénaires. Les études phylogénétiques par Scora (1975) et Barrett et Rhodes (1976) ont suggéré que la diversité des agrumes se structure uniquement autour des trois espèces "vraies" : pamplemoussiers (*C. maxima* (Burm.) Merr.), mandariniers (*C. reticulata* Blanco) et cédratiers (*C. medica* L.). La différenciation entre ces taxons sexuellement compatibles s'explique par un processus de fondation dans trois zones géographiques (pamplemoussiers : archipel malais et Indonésie, cédratiers : Nord-est de l'Inde et régions voisines de Birmanie et de Chine, mandariniers : Vietnam, la Chine du sud et le Japon (Webber *et al.*, 1967; Scora, 1975) et par une évolution allopatrique (spéciation qui a lieu quand deux populations ou plus d'une espèce sont physiquement séparées ainsi elles ne peuvent pas se croiser) (Nicolosi *et al.*, 2000). Des études moléculaires récentes ont conclu à l'implication d'un quatrième taxon additionnel ancestral, *C. micrantha* Wester (Nicolosi *et al.*, 2000; Froelicher *et al.*, 2011). L'apparition des autres espèces cultivées : orangers, bigaradiers, citronniers, pomelos, limettiers, a eu lieu ensuite par hybridation entre ces taxons de base mis en contact par les échanges commerciaux et les migrations humaines (Herrero *et al.*, 1996b; Federici *et al.*, 1998; Ollitrault *et al.*, 1999; Nicolosi *et al.*, 2000).

Les études moléculaires supportent ce concept (Herrero *et al.*, 1996b; Federici *et al.*, 1998; Nicolosi *et al.*, 2000; Gulsen and Roose, 2001a,b; Moore, 2001; Froelicher *et al.*, 2011; Garcia-Lor *et al.*, 2012, 2013; Ollitrault *et al.*, 2012a) et ont permis de conduire aux conclusions suivantes:

- L'oranger commun (*Citrus sinensis*) et le bigaradier (*Citrus aurantium*) sont considérés comme les hybrides entre les pools génétiques des pamplemoussiers et des mandariniers.
- Le limettier mexicain (*Citrus aurantifolia*) résulte probablement d'une hybridation directe entre un cédratier et *C. micrantha* (un papeda)
- Les citrons (*Citrus limon*) dériveraient d'une hybridation entre un cédratier et un bigaradier
- Le pomelo (*Citrus paradisi*) serait un hybride entre un pamplemoussier et un oranger

La recherche en généalogie des agrumes est cependant complexe à cause de la grande diversité et de l'éloignement des centres d'origine. La localisation précise des zones d'origine des différentes espèces a fait l'objet de controverse. Les zones de diversité actuelle et les études historiques témoignent en faveur de trois zones de diversification primaires des agrumes (Webber *et al.*, 1967; Scora, 1975) :

- Le nord-est de l'Inde, le nord de Birmanie et le sud de Chine seraient les zones de diversification du cédrat (*C. medica*) et d'apparition de la lime (*Citrus aurantifolia*), du citron (*Citrus lemon*), du bigaradier (*Citrus aurantium*) et de l'orange (*Citrus sinensis*).
- L'archipel Malais et l'Indonésie auraient constitués le centre d'origine du pamplemousse (*Citrus grandis*).
- Les mandariniers se seraient diversifiés sur une vaste zone couvrant le Vietnam, la Chine du sud et le Japon (Fig. 6).

Le parfum, la couleur, les huiles essentielles des feuilles et des fruits des agrumes ont depuis les temps anciens suscité l'attention et la curiosité de l'Homme. De ce fait, il leur a attribué des vertus médicinales et a utilisé les sous-produits de ces plantes bien avant de commencer à cultiver celles-ci. Certains disaient même "***Le fruit d'agrumes est un cadeau divin***" (Calabrese, 2002).

La Chine a été l'un des principaux centres de culture des agrumes depuis au moins trois millénaires. Les premières traces d'agrumes en Chine ont été signalées dans un livre écrit durant la dynastie *Chou* (1027-256 avant Jésus-Christ (J-C)). L'Inde est l'autre pays asiatique où les agrumes étaient connus depuis les temps anciens. Une collection de textes sacrés écrits en Sanskrit (antérieur à 800 avant J-C) mentionne le cédrat et le citron. Les mémoires du célèbre roi de Hindustan (1519 après J-C) incluent des informations sur la culture des agrumes au nord de l'Inde (cités par Gallesio, 1811; Tolkowski, 1938). Le fruit japonais type-mandarine le plus populaire a été introduit de Chine seulement en 1500 après J-C. Il s'agit de la fameuse "mandarine Satsuma" (cités par Tolkowski, 1938).

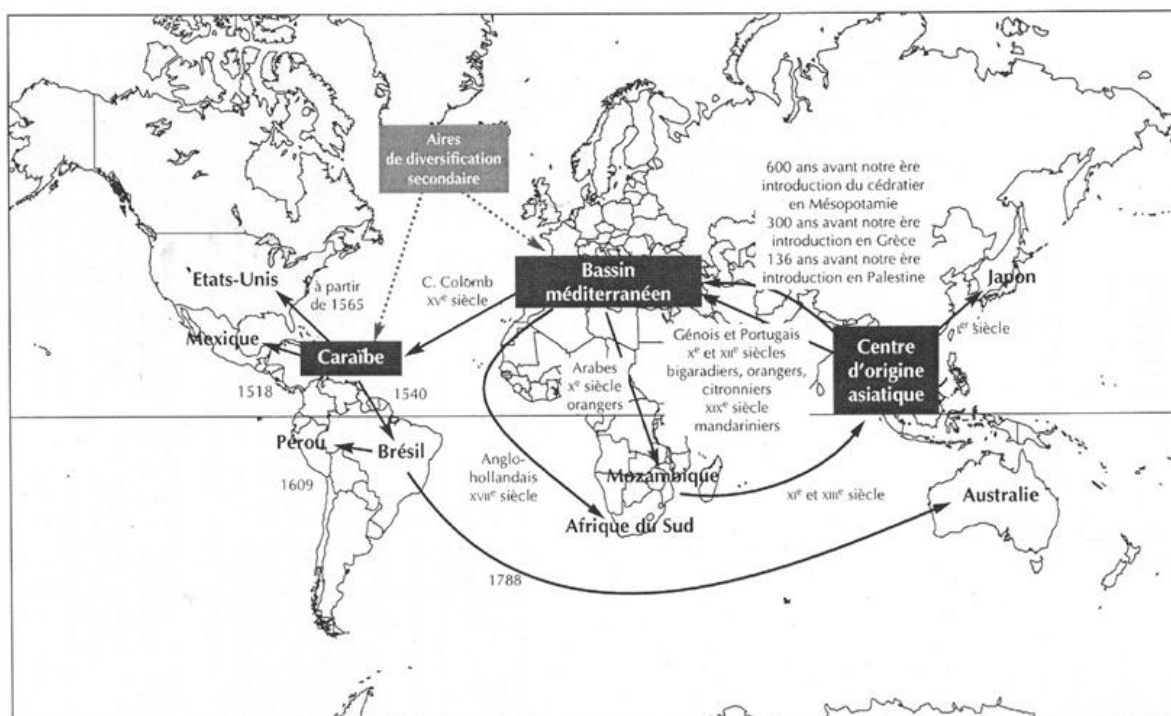


Figure 6. Région d'origine, dispersion et zones de diversification des agrumes cultivés.
(Ollitrault *et al.*, 1999)

En Mésopotamie, les assyriens et les babyloniens gouvernaient la vaste région entre les rivières du Tigre et d'Euphrate jusqu'en 539 avant J-C. Des graines d'agrumes ont été découvertes dans des sites archéologiques à Nippur, à cette époque les babyloniens étaient considérés comme des agriculteurs de talent ayant créé un système ingénieux d'irrigation. Les assyriens eux ont préservé leur histoire sur des tablettes en terre cuite, ces dernières illustraient des listes de plantes dont "*iltakku*" pour désigner le cédrat qui était importé de Médie en Assyrie. Ceci démontre bien que la culture du cédratier était importante en Médie au 7^{ème} siècle avant J-C.

Le cédrat, le citron, la lime sont clairement vus sur plusieurs mosaïques, fresques, sculptures à Rome, Carthage, Sicile, Numidie (Tunisie, Algérie), Pompéi, Espagne. Introduit en Grèce au troisième siècle avant J-C, le cédrat était désigné "le fruit d'or" et faisait l'objet de légendes révélées dans les temples grecques et sur les mosaïques romaines à la "villa del Casale" à la place publique d'Armerina en Sicile. Les Grecques ont beaucoup bénéficié des vertus du cédrat en utilisant le fruit et les feuilles pour parfumer leurs habits ou pour se protéger des mites. Le fruit était aussi utilisé comme un remède antipoison.

Le cédratier a été la première espèce cultivée dans le bassin méditerranéen, quelques siècles avant notre ère, tandis que les autres espèces n'y ont été introduites qu'au cours du deuxième millénaire (Webber *et al.*, 1967). Les arabes occupant les territoires de la Méditerranée et développant l'agriculture au nord de l'Afrique et au sud de l'Europe ont introduit de nouvelles plantes et techniques culturelles. Les bigaradiers dotés d'une valeur décorative exceptionnelle chez les arabes ornaient leurs jardins et mosquées. Parmi les savants et écrivains arabes, Ibn al-Awwâm, de Séville, a écrit un traité très important en trente quatre chapitres sur l'agriculture où il a décrit le cédratier (avec ses fruits acides et doux), le citron, le bigaradier et le pamplemousse ("*fruit d'Adam*"), leur culture et la conservation de leurs fruits (Calabrese, 2002). Il est considéré comme le premier à parler de l'utilisation comme parfum de l'huile extraite de l'écorce des bigarades. Ibn el-Beithârvis (douzième siècle) en tant que botaniste et médecin a approfondi cette question. La poésie arabe a aussi dédié de merveilleux poèmes aux fruits des agrumes. Ci-dessous un exemple pris d'un poème d'Abd Ar-Ramân (un poète arabe sicilien) :

"برتقال الجزيرة مثل اللميب"	"Les oranges de l'île sont comme des flammes
يلمع بين الأغصان الزمردة	brillant entre les branches émeraude
والليمون يعكس اصفرار مغرم	et le citron reflète la pâleur d'un amoureux
يمضي الليل يبكي	qui passe la nuit en larmes
من حزن الفراق"	pour la peine de la séparation"

A la fin du moyen âge le cédrat, le citron, la lime et le bigaradier ont été largement cultivés en Italie et d'autres pays européens essentiellement en Espagne où leurs fruits ont été produits pour le commerce (cités par Tolkowski, 1938; Calabrese, 1998). Vasco de Gama a rapporté que les portugais ont connu l'orange douce ou commune en Afrique, en Inde et en Chine. Valmont de Bomare était le premier écrivain à mentionner que "l'orange de Chine" est cultivé à Lisbonne en 1520; L'espèce porte encore leur nom, en arabe (bourtougan), en persan (pôthogal). Cependant, d'autres auteurs indiquent qu'à la fin du treizième siècle, les génois étaient les premiers à avoir introduit l'orange commune au bassin méditerranéen dans le cadre de leur commerce. Les conquistadores espagnols et portugais vont pour leur part introduire les agrumes en Amérique.

Durant la période de renaissance allant du 15^{ème} au 17^{ème} siècle, les agrumes ornaient le paysage des jardins des familles aristocratiques en Italie, en France, en Allemagne, en Belgique et en Hollande (cités par Gellasio, 1811; Tolkowski, 1938). A partir de 1700, deux nouvelles espèces d'agrumes entraient dans l'industrie agrumicole en Italie et en Floride : la bergamote et le pomélo. La culture commerciale des mandarines méditerranéenne a débuté en Sicile au début du 19^{ème} siècle, puis a vite été diffusée dans tous les pays de la Méditerranée. La clémentine a été découverte sous forme de plant en Algérie par le père Clément Rodier en 1902. La culture d'agrumes a atteint tous les continents. Aujourd'hui les fruits d'agrumes sont le symbole de la prospérité qui apporte partout couleur et parfum.

3-5- La création et la sélection de variétés chez les agrumes

La sélection humaine s'est manifestée, dans un premier temps, il y a plusieurs millénaires, sur la domestication des agrumes d'intérêt, et par la suite sur le maintien et la multiplication des variants. Ce n'est qu'à partir du début du XIX^{ème} siècle que l'homme a réellement essayé d'orienter la création d'hybrides en contrôlant la pollinisation.

Les projets d'amélioration variétale formulent plusieurs objectifs selon l'espèce, il s'agit d'élargir la saison de maturation (cultivars à maturation précoce ou tardive), la production de fruits sans pépins et faciles à éplucher (pour les mandariniers), la résistance au froid, une meilleure standardisation des fruits (forme et taille) et de la composition chimique du fruit, une maîtrise du comportement post-récolte et la résistance à la plupart des maladies et des ravageurs nuisibles. D'autres objectifs visent la diversification de la gamme variétale autour d'un idéo-type (par exemple la clémentine). Les améliorateurs d'agrumes, tirant profit de la propagation végétative, mettent tout leur effort dans l'induction du polymorphisme dans un seul cycle à partir duquel ils font de la sélection clonale. La sélection concerne donc ou bien les mutations spontanées identifiées en verger, ou les génotypes obtenus par hybridation, la mutagenèse induite, ou encore après avoir eu recours aux différentes approches biotechnologiques (hybridation somatique, transformation) (Ollitrault et Navarro, 2012).

Actuellement, les biotechnologies peuvent donner des résultats significatifs en amélioration par le transfert de gènes qui contrôlent la résistance aux maladies, insectes et herbicides, mais leur application pour l'amélioration des caractères quantitatifs, comme l'efficacité et l'efficacité ainsi que la qualité des fruits, ne semble se dégager dans l'immédiat. Pour cela, une intégration équilibrée des deux méthodes d'amélioration (conventionnelle et biotechnologies),

est probablement le meilleur chemin à suivre pour le développement de l'industrie des agrumes (Nicotra, 2001).

La reproduction sexuée est principalement utilisée pour la diversification chez les mandarines et pour l'amélioration des porte-greffes (Forner *et al.*, 2003). Les ressources génétiques effectivement exploitées par voie sexuée apparaissent restreintes et peu de cultivars commerciaux largement cultivés à travers le monde sont issus de programmes d'amélioration conventionnelle (Ollitrault et Navarro, 2012). En effet, plusieurs facteurs limitent l'utilisation de la voie sexuée comprenant entre autres (1) la polyembryonie, (2) la stérilité mâle et femelle, (3) l'auto-incompatibilité, (4) la forte hétérozygotie ou encore (5) la longueur de la phase juvénile.

Néanmoins, la création variétale conventionnelle et la sélection ont permis le développement de certains hybrides dont les mandarines hybrides tangelos (mandarine *C. reticulata* Blanco X pomélo *C. paradisi* Macf.) et tangors (mandarine *C. reticulata* Blanco X orange douce *C. sinensis* (L.) Osb.). Les cultivars commerciaux de Tangelo les plus importants, sont Orlando et Minneola. Quelques hybrides entre mandariniers (Fairchild, Fortune, Wilking, Fremont, Kara, Nova, Kinnow) se sont également révélés intéressants (Cameron et Frost, 1968; Davies et Albrigo, 1994).

Par ailleurs, l'hybridation a été envisagée par des croisements de diploïdes et de tétraploïdes afin d'obtenir des cultivars triploïdes à l'image des triploïdes spontanés comme le limettier Tahiti. Les principaux cultivars issus de ces programmes sont Melogold et Oroblanco (Pamplemoussier X Pomélo). La sélection de lignées triploïdes est la voie classique pour développer des cultivars aspermes, puisque les triploïdes sont généralement des mâles et des femelles stériles. Plusieurs méthodes ont été développées pour la création de mandariniers triploïdes (Navarro *et al.*, 2003; Tokunaga *et al.*, 2005; Ollitrault *et al.*, 2008; Aleza *et al.*, 2010a; Aleza *et al.*, 2012a,b). Une liste de mandariniers hybrides triploïdes nouvellement sélectionnés est disponible (Aleza *et al.*, 2010a). Par ailleurs, deux nouveaux hybrides de mandariniers triploïdes ont été révélés, "Garbi" à maturité tardive (Aleza *et al.*, 2010b) et "Safor" mi-tardive (Cuenca *et al.*, 2010).

La sélection de mutants spontanés a fourni de bons résultats pour le Clémentinier en Espagne (Bono *et al.*, 1982), au Maroc et en Corse, pour l'étalement de la période de récolte, l'amélioration des calibres ou de la coloration des fruits. Dans plusieurs régions, les cultivars largement cultivés sont des sélections locales issues de mutations et choisies pour leur

adaptabilité durant une longue période de temps. Un excellent exemple est celui de la mandarine Satsuma (*C. unshiu*) au Japon (Davies et Albrigo, 1994).

Le XX^{ème} siècle a vu le l'utilisation de techniques comme la mutagenèse ou des biotechnologies (création d'hybrides somatiques, transgénèse).

La mutagenèse induite s'est avérée un bon outil pour la recherche de cultivars aspermes. Au Texas, quelques mutants de coloration ont été obtenus comme le pomélo rouge et asperme Star-Ruby (1970) issu du programme d'irradiation du pomélo Hudson à chair rouge mais contenant jusqu'à 40 graines par fruit (Spiegel-Roy et Golschmidt, 1996).

Quant aux hybridations somatiques, elles ont permis l'obtention par fusion de protoplastes d'hybrides allotétraploïdes qui ont été utilisés comme parents dans des croisements avec des diploïdes afin de produire des cultivars d'agrumes triploïdes, sans pépins et faciles à éplucher (Wu *et al.*, 2005). De tels triploïdes ont également pu être obtenus par fusion de protoplastes haploïdes et diploïdes. Le critère "absence de pépins" est très important pour le marché du fruit frais, la recherche de stérilités femelles est donc devenue un objectif majeur de sélection tout comme la stérilité mâle afin d'éviter toute pollinisation croisée sur des cultivars auto-incompatibles (Ollitrault *et al.*, 2000a). Dans le cadre de programme d'amélioration du citronnier (Tusa *et al.*, 1996) et du pamplemoussier (Deng *et al.*, 1996) la faisabilité de la synthèse de triploïdes a été montrée. Le projet d'hybridation somatique le plus important pour l'amélioration des porte-greffes était en Floride (Grosser *et al.*, 2000). Dans le monde, plusieurs hybrides interspécifiques et intergénériques combinant des traits horticoles prometteurs et de tolérance aux pathogènes comme *CTV* et *Phytophthora* sp. Sont en cours d'évaluation. À une moindre échelle et au niveau du bassin méditerranéen, des hybrides somatiques entre *Poncirus* et *Citrus* ont été créés afin de combiner les tolérances aux stress biotiques et abiotiques spécifiques à la région (Ollitrault *et al.*, 2000a). Il est cependant à noter qu'à ce jour, la plupart des variétés commerciales sont issues de variations ou d'hybridations spontanées.

3-6- Organisation de la diversité génétique et phénotypique

3-6-1- Diversification interspécifique

La diversité génétique repose sur les variations de séquences d'ADN codantes (gènes) ou non codantes. Le changement de la séquence d'un gène peut éventuellement entraîner une

modification qualitative ou quantitative de son expression, et par conséquent de son produit, la protéine, et *in fine* du phénotype de l'individu. La diversité génétique résulte donc de l'ensemble des phénomènes de modification de l'ADN (mutations, recombinaison sexuée) associé aux effets de la sélection naturelle ainsi qu'à l'action de l'homme. Certains facteurs notamment ceux liés à la reproduction ont fortement influencé la diversification génétique en favorisant ou en limitant les flux de gènes. Parmi les 3 genres botaniques des agrumes : *Poncirus*, *Fortunella* et *Citrus*, ce dernier est le plus diversifié. Cette diversité relativement importante trouve sa source dans la compatibilité sexuelle interspécifique et la polyembryonie.

Il a été rapporté que le degré de diversité génétique au sein des groupes d'agrumes diffère selon qu'ils constituent les espèces ancestrales ou qu'ils forment les espèces dérivées. En effet, étant donné que les trois espèces ancestrales (cédrat, mandarine, pamplemousse) ne sont pas apomictiques, elles se reproduisent uniquement par voie sexuée. De ce fait, certains mandarines, pamplemousses et cédrats présentent des degrés de diversité génétique supérieurs aux groupes d'orange, pomélo, citron et certaines mandarines (Satsumas et clémentines), qui eux sont originaires de plants nucellaires. Ceci dit, ces derniers groupes comportent aussi beaucoup de variétés avec des différences importantes quant aux traits horticoles (Herrero *et al.*, 1996a). Le tableau 2 résume les informations actuelles relatives à l'origine, au mode de reproduction et au degré de diversité génétique au sein des espèces commercialement importantes du genre *Citrus*.

Tableau 2. Une synthèse sur le genre *Citrus*.

(Krueger & Navarro, 2007)

Espèces	Nom commun	Connu Age (années)	Année nommé	Origine probable	Habitat d'origine probable	Reproduction par graines	Diversité génétique
<i>C. medica</i>	Cédrat	2300	1753	Espèce vraie	Inde	Sexuelle	Modérée
<i>C. aurantium</i>	Bigarade	900	1753	Hybride	Chine	Nucellaire	Faible
<i>C. sinensis</i>	Orange douce	500	1757	Hybride	Chine	Nucellaire	Faible
<i>C. maxima</i>	Pamplemousse	2000 (?)	1765	Espèce vraie	Chine	Sexuelle	Elevée
<i>C. limon</i>	Citron	800	1766	Hybride	Inde	Partiellement sexuelle	Modérée
<i>C. reticulata</i>	Mandarine	2000 (?)	1837	Espèce vraie	Chine	Variable	Elevée
<i>C. aurantifolia</i>	Lime	700	1913	Hybride	Malaisie	Partiellement sexuelle	Modérée
<i>C. paradisi</i>	Pomelo	200	1930	Hybride	Barbade	Nucellaire	Faible
<i>C. tachibana</i>	Tachibana	2000 (?)	1924	Inconnue	Japon	Sexuelle	Modérée (?)
<i>C. indica</i>	Orange Sauvage indien	2000 (?)	1931	Inconnue	Inde	Sexuelle	Modérée (?)
<i>C. hystrix</i>	Papeda Mauritiuis	2000 (?)	1813	Inconnue	S.E. Asie	Sexuelle	Modérée (?)
<i>C. macroptera</i>	Papeda Malaisien	2000 (?)	1860	Inconnue	S.E. Asie	Sexuelle	Modérée (?)
<i>C. celebica</i>	Papeda Celebes	2000 (?)	1898	Inconnue	Célèbes	Sexuelle	Modérée (?)
<i>C. ichangensis</i>	Papeda Ichang	2000 (?)	1913	Inconnue	Chine	Sexuelle	Modérée (?)
<i>C. micrantha</i>	Papeda	2000 (?)	1915	Inconnue	Philippines	Sexuelle	Modérée (?)
<i>C. latipes</i>	Papeda Khasi	2000 (?)	1928	Inconnue	Assam	Sexuelle	Modérée (?)

- Variabilité agro-morphologique :

L'observation morphologique est la base de la description du matériel végétal. La variabilité agro-morphologique des agrumes est considérable. Elle concerne aussi bien les caractères pomologiques et organoleptiques que les résistances aux facteurs biotiques et abiotiques et ouvre de très larges perspectives pour l'utilisation des ressources génétiques en amélioration variétale. Pour les facteurs abiotiques : la tolérance au froid des Mandariniers Satsuma ; la tolérance à la salinité du limettier Rangpur et du mandarinier Cléopâtre ; la tolérance aux sols calcaires de *C. jambhiri*, de *C. macrophylla*, de *C. volkameriana*, de *C. amblycarpa* et du bigaradier ; la tolérance à la sécheresse du limettier Rangpur (Ollitrault *et al.*, 1999). Des tolérances aux principaux ravageurs et maladies sont également identifiées : la tolérance à *Phytophthora* sp. des pamplemoussiers, des bigaradiers, de *C. volkameriana* et de *C.*

amblycarpa ; la tolérance à la cercosporiose africaine des agrumes (maladie fongique due à *Phaemularia angolensis*) des pamplemoussiers, des citronniers et des mandariniers Satsuma ; immunité à la tristeza de *Poncirus trifoliata* et la tolérance du mandarinier Cléopâtre, de *C. amblycarpa*, du limettier Rangpur, de *C. jambhiri* et de *C. volkameriana*. La tolérance au blight de l'oranger ; la tolérance au *greening* des pamplemoussiers ; la résistance des acariens phytophages du Pomelo Marsh et des mandariniers Satsuma.

Une telle répartition des sources de résistance aux facteurs biotiques ne montre pas de liens avec la structuration spécifique du genre *Citrus*. A l'inverse, la variabilité morpho-physiologique est fortement marquée au sein des espèces. Elle s'apprécie le plus aisément par : le diamètre des fruits, l'albédo, la couleur des fruits et leur acidité, la taille et la forme des feuilles, la morphologie de l'arbre, tous ces paramètres varient considérablement suivant les espèces. Dans des collections d'agrumes, l'évaluation quantitative et qualitative de la diversité globale est réalisée selon les standards de description internationale préconisés par l'IPGRI et l'UPOV. Une étude de la structuration de la diversité morphologique dans le genre *Citrus* a été réalisée à partir de 20 descripteurs de l'appareil végétatif observés sur 74 cultivars (Ollitrault *et al.*, 1999). Cette étude a permis de retrouver la structuration globale autour de trois pôles (mandariniers, pamplemoussiers, cédratiers) qui sont confirmés par les données moléculaires (Fig. 7).

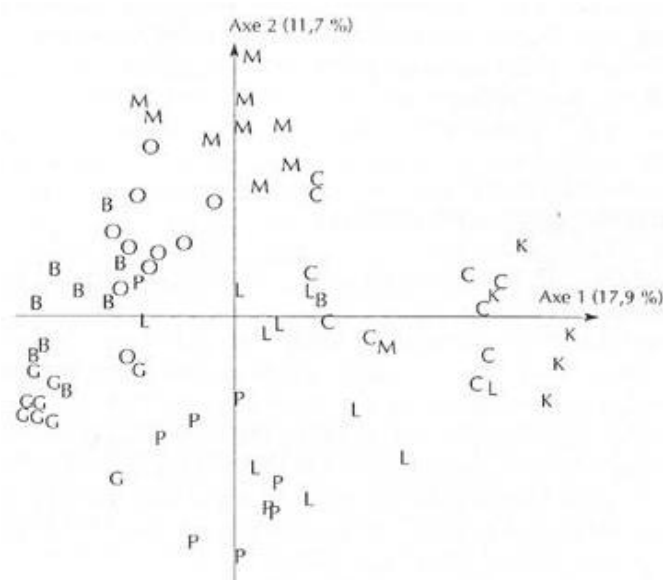


Figure 7. Diversité morphologique : représentation du premier plan factoriel de l'AFTD réalisée sur une matrice de distance de Sokal et Michener entre 74 cultivars sur la base de 20 descripteurs végétatifs. B : Bigaradiers et bouquetiers, C : citronniers, G : pomelos, K : cédratiers, L : limettiers, M : mandariniers, O : orangers, P : pamplemoussiers.

(Ollitrault *et al.*, 1999)

- Variabilités biochimique et moléculaire :

Les huiles essentielles et les polyphénols ont été les premiers marqueurs utilisés pour caractériser les variétés (Tatum *et al.*, 1974) et pour étudier la phylogénie des agrumes (Scora, 1988). Les isoenzymes ont été appliqués pour identifier les plants de semis zygotiques et nucellaires (Soost *et al.*, 1980; Khan et Roose, 1988; Ollitrault *et al.*, 1992). Elles ont également permis de cerner les relations phylogénétiques entre les espèces (Herrero *et al.*, 1996 a,b) et l'origine génétique de porte-greffes (Ollitrault et Faure, 1992) et de variétés (Elisiario *et al.*, 1999 a,b). Le développement des marqueurs moléculaires de l'ADN a permis de mieux cerner l'organisation de la diversité des agrumes (relations interspécifiques) et de l'évaluer quantitativement (diversité allélique, hétérozygotie).

Durant les deux dernières décennies, plusieurs de nombreuses études moléculaires ont été réalisées pour étudier la diversité, l'origine et les relations génétiques au sein du genre *Citrus* et ses groupes apparentés, incluant : RAPD (Federici *et al.*, 1998; Nicolosi *et al.*, 2000), RFLP (Federici *et al.*, 1998), analyse PCR-RFLP des régions non-codantes de l'ADN chloroplastique (Asadi Abkenar *et al.*, 2004), ISSR (Fang *et al.*, 1997, 1998; Gulsen et Roose, 2001 a,b; Yang *et al.*, 2010), CAPS (Lotfy *et al.*, 2003), analyse de séquence de région ADNcp (Nicolosi *et al.*, 2000; de Araújo *et al.*, 2003; Jung *et al.*, 2005), AFLP (Pang *et al.*, 2007), régions ITS de l'ADN ribosomal (Kyndt *et al.*, 2010), IRAP et REMAP (Biswas *et al.*, 2010), analyse du génome organelle (Yamamoto *et al.*, 1993), SSRs (Kijas *et al.*, 1995; Luro *et al.*, 2001; Pang *et al.*, 2003; Garcia-Lor *et al.*, 2012), SNPs (Novelli *et al.*, 2004 ; Garcia-Lor *et al.*, 2013; Ollitrault *et al.*, 2012a), des marqueurs mitochondriaux (Froelicher *et al.*, 2011). Ces études moléculaires ont fourni des évidences fortes quant à la structuration de la diversité.

- Structuration globale des formes cultivées

Des études cytogénétiques et des analyses par cytométrie en flux ont par ailleurs démontré l'existence de fortes variations entre les espèces quant à la taille des génomes (Ollitrault *et al.*, 1994, 1999). Les valeurs extrêmes obtenues pour *C. medica* et *C. reticulata* confirment leurs rôles ancestraux chez les agrumes cultivés; les tailles estimées des génomes des espèces secondaires sont en accord avec leurs origines hybrides putatives (Ollitrault *et al.*, 1994). Par ailleurs, ces études ont aussi mis en évidence de nombreux cas d'hétérozygotie structurelle (Gmitter *et al.*, 1992; Miranda *et al.*, 1997). En termes d'évolution, ces éléments sur la structure des génomes des différents taxons sont déterminants pour analyser l'organisation de la diversité intraspécifique.

Les conclusions tirées des données isoenzymatiques (Herrero *et al.*, 1996a,b ; Ollitrault *et al.*, 1999), RFLP (Federici *et al.*, 1998), RAPD et SCAR (Nicolosi *et al.*, 2000), STMS (Luro *et al.*, 1999), et des données de polymorphismes moléculaires (SNPs et InDels, Garcia-Lor *et al.*, 2013), sont globalement convergentes. En comparaison avec l'ADN nucléaire, l'ADN chloroplastique est conservatif et maternellement hérité, son analyse nous permet de tracer en arrière vers le type original. Les orangers et bigaradiers proches des mandariniers ont clairement introgressé des fragments du génome nucléaire de pamplemoussier dont l'implication comme parent femelle est démontrée par l'analyse du génome chloroplastique (Green *et al.*, 1986 ; Nicolosi *et al.*, 2000). Une étude récente a fourni une nouvelle idée sur l'origine de l'oranger (*C. Sinensis*), contredisant l'hypothèse attestant que *C. sinensis* est soit un hybride interspécifique direct entre un pamplemoussier (*C. maxima*) et un mandarinier (*C. reticulata*) (Nicolosi *et al.*, 2000; Moore, 2001), soit qu'il est issu de rétrocroisement1 ((*C. maxima* x *C. reticulata*) x *C. reticulata*) (Roose *et al.*, 2009; Garcia-Lor *et al.*, 2012) entre les pools de gènes *C. maxima* et *C. Reticulata* (Garcia-Lor *et al.*, 2013).

L'alliance du cédratier, des limettiers et des citronniers est clairement établie par les analyses de diversité allélique (isozymes) et l'étude des caractères morphologiques. Par ailleurs, les hypothèses sur l'origine du citronnier sont très divergentes. Selon Nicolosi *et al.* (2000) les marqueurs moléculaires indiquent que cette espèce pourrait être issue d'une hybridation entre bigaradier et cédratier. Le limettier est la seule espèce qui implique comme parent un taxon extérieur aux agrumes cultivés ; les travaux réalisés par Nicolosi *et al.* (2000) suggèrent que le limettier CV mexicain (*C. aurantifolia*) serait issu d'une hybridation entre le cédrat (parent mâle) et *C. micrantha* (parent femelle).

La forte structuration encore observée aujourd'hui au niveau moléculaire et morphologique, indique que les brassages génétiques entre les trois groupes originels sont restés limités. L'apomixie partielle, liée à la polyembryonie, a très certainement été un élément essentiel dans la limitation des flux de gènes. D'autres facteurs comme la différenciation structurelle des génomes ont du également favoriser le maintien de déséquilibres gamétiques en limitant la recombinaison sur de larges portions du génome.

3-6-2- Diversification intraspécifique

Les différents travaux d'analyse de la diversité moléculaire intraspécifique au sein des espèces cultivées témoignent de structures très contrastées (isoenzymes: Ollitrault *et al.*, 1999; RFLP: Federici *et al.*, 1998; microsatellites: Kijas *et al.*, 1995). Les cédratiers y

présentent une diversité allélique très faible due à une forte homozygotie et à un faible polymorphisme entre les cultivars. Les pomelos, les orangers et les bigaradiers ont des structures intraspécifiques similaires. Ils présentent une diversité allélique et une hétérozygotie importante mais le polymorphisme intercultivar est inexistant. Quant aux citronniers, ils sont très hétérozygotes et leur polymorphisme intervariétal est faible. Les limettiers sont également très hétérozygotes mais montrent un plus fort polymorphisme intervariétal que les citronniers. Les mandariniers et les pamplemoussiers affichent une grande richesse allélique essentiellement due à un fort polymorphisme intervariétal sans écart significatif à la panmixie.

Bien que les deux niveaux morphologique et moléculaire révèlent une structuration globale similaire de la diversité des agrumes cultivés, ils divergent pour ce qui est de la quantification de la diversité intraspécifique.

En particulier, la diversité intraspécifique de la plupart des espèces secondaires est essentiellement dûe aux mutations ou aux variations épigénétiques à partir d'hybride interspécifique ancestral sans recombinaison sexuée additionnelle (Ollitrault *et al.*, 2003).

Les données isoenzymatiques témoignant d'hétérozygotie généralement élevée et d'absence de polymorphisme inter variétal (Herrero *et al.*, 1996a; Ollitrault *et al.*, 1999), confirmées avec les données issues des marqueurs RAPD et SCAR (Nicolosi *et al.*, 2000), des SSRs (Luro *et al.*, 2001; Barkley *et al.*, 2006; Garcia-Lor *et al.*, 2012), des SNPs (Ollitrault *et al.*, 2012a), prouvent qu'il s'agit de cas typiques de fausses espèces, pour lesquelles la diversification variétale s'est produite à partir d'un hybride ancestral par accumulation de mutations sans qu'intervienne la recombinaison sexuée. La sélection humaine, particulièrement marquée pour les caractères pomologiques et phénologiques, couplée à la multiplication végétative, peut entraîner une diversification des caractères morpho-physiologiques rapide et indépendante de l'évolution moléculaire globale visualisée par des marqueurs de type isoenzymatiques, RFLP ou microsatellites. Il est à noter que tous les cultivars de ces espèces secondaires sont polyembryonnés, ce qui a permis de fixer l'hétérozygotie et de conserver le type morphologique et pomologique alors que les méthodes de propagation végétative (marcottage, bouturage ou greffage) n'existaient pas.

Pour les mandariniers, la sélection de mutations a également été le moteur de la diversification de certains groupes variétaux comme les mandariniers Satsuma au Japon ou les clémentiniers dans le Bassin Méditerranéen. En effet, l'exemple le plus flagrant est celui du

clémentinier. Il y a un siècle, sélectionné par le père Clément, ce groupe variétal est issu d'un plant de semis d'origine zygotique de mandarinier commun. Multiplié végétativement par greffage, il a connu depuis une diversification considérable, résultat d'une simple sélection en verger des mutations de bourgeons. Cette diversification touche la précocité (production de septembre à fin février) ainsi que la productivité et les caractères pomologiques (calibre, coloration, présence de pépins) (Bono *et al.*, 1982). Sur une échelle de temps plus longue, la diversification des orangers est également remarquable. Cette espèce, pour laquelle aucune diversité moléculaire n'a pu être mise en évidence que ce soit avec les isoenzymes (Ollitrault *et al.*, 1999), les RAPD (Luro *et al.*, 1994) ou les microsatellites (Luro *et al.*, 1995) présente pourtant un polymorphisme morphologique et phénologique très importants. Le Bassin Méditerranéen constitue le principal centre de diversification des variétés modernes d'orangers (Aubert, 2000).

Par ailleurs, la recombinaison sexuée a dû jouer un rôle déterminant dans la diversification intercultivar observée au niveau moléculaire chez les pamplemoussiers (cultivars tous monoembryonnés) et des mandariniers (dont certains cultivars sont monoembryonnés) (Ollitrault *et al.*, 1999). Parmi les trois espèces de base, les pamplemoussiers et les mandariniers présentent un polymorphisme moléculaire important. Les deux figures suivantes sont présentées afin de mieux schématiser la diversification des agrumes cultivés (Fig. 8) et montrer l'organisation globale de ces agrumes autour de *C. reticulata*, *C. maxima*, et *C. medica* (Fig. 9).

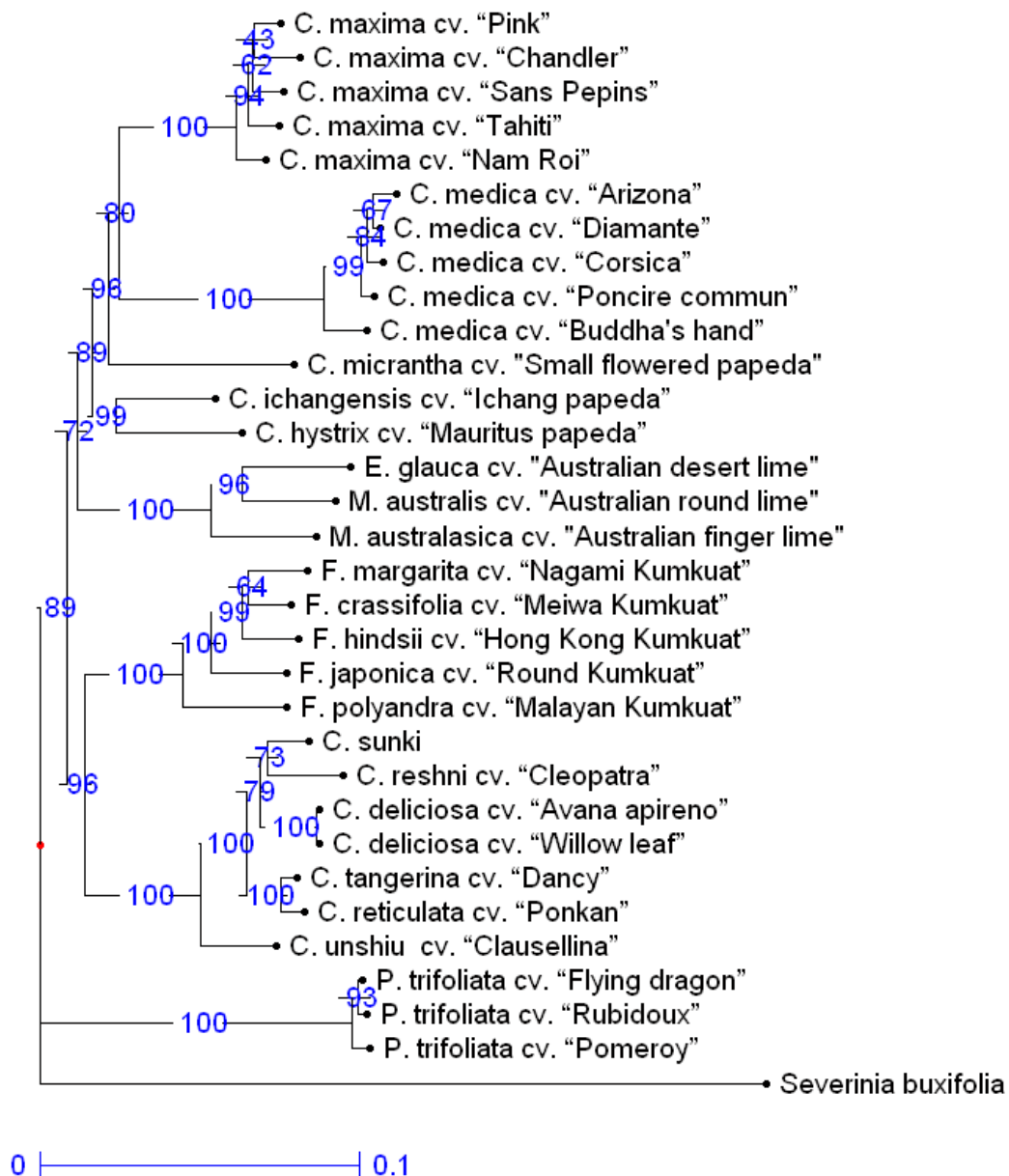


Figure 8. Arbre NJ avec 1097 marqueurs SNPs identifiés chez les espèces ancestrales des agrumes et leurs espèces apparentées (1000 bootstraps réalisés). Les supports des branches supérieurs à 40% sont présentés. (Garcia-Lor *et al.*, 2013)

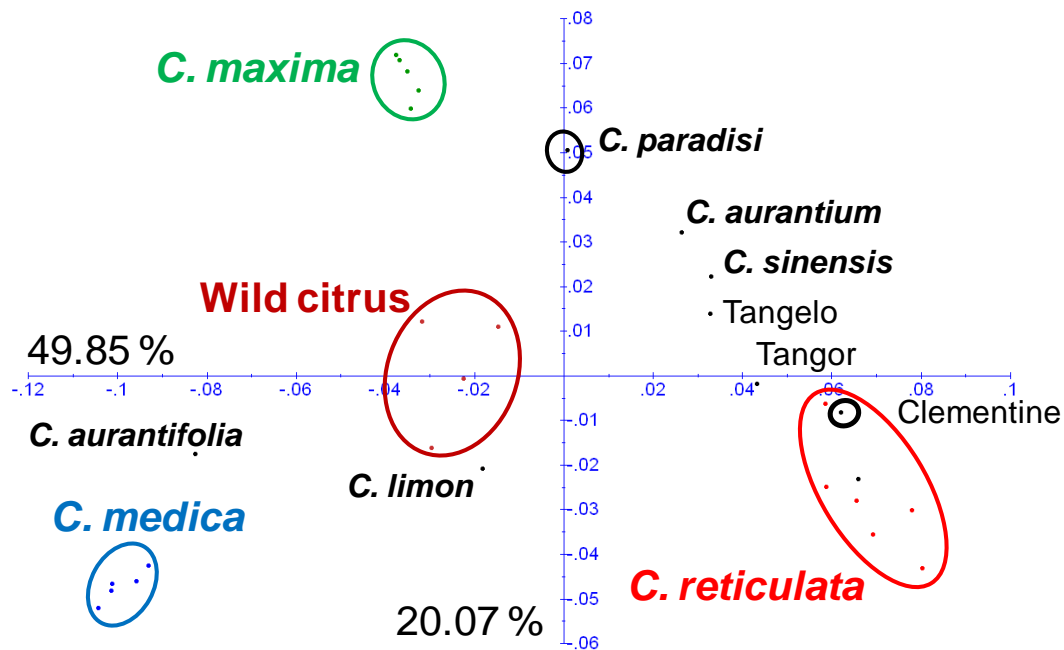


Figure 9. Relations génétiques entre les espèces d'agrumes et les taxons de base (analyse factorielle; axes 1/2).
(Garcia-Lor *et al.*, 2013)

IV- Les marqueurs moléculaires et leur apport pour la gestion des ressources génétiques et l'amélioration des plantes

4-1- Les collections d'agrumes au niveau international

Les ressources génétiques des plantes destinées à l'alimentation et à l'agriculture sont la base de la sécurité alimentaire mondiale. Elles incluent la diversité du matériel génétique contenue dans les variétés traditionnelles, les espèces sauvages et les cultivars modernes (Rao, 2004).

Il demeure incontestable que la perte des ressources génétiques augmente de jour en jour et ce pour plusieurs raisons : déforestation, destruction de l'écosystème, pollution, urbanisation, agriculture moderne, introduction de variétés nouvelles et uniformes, Etc. De ce fait, la préoccupation mondiale sur ce sujet suscite des actions à l'échelle internationale comme la mise en œuvre de programmes de conservation des ressources génétiques des plantes destinées à l'alimentation et à l'agriculture ainsi que la mise en place de banques de gènes dans plusieurs pays. L'idéal serait de conserver les ressources génétiques *in situ*. Cependant, les facteurs cités ci-dessus rendent l'entretien des ressources génétiques *in situ* plutôt précaire. Pour cela, la conservation *ex situ* est souvent nécessaire et le maintien du germoplasme dans un état indemne de maladies est souhaitable. Les collections *ex situ* ont l'avantage d'être plus

accessibles aux chercheurs pour toute action de caractérisation, d'évaluation et d'utilisation (Krueger et Navarro, 2007). Dans ce sens, un "germoplasme" végétal est un tissu à partir duquel de nouvelles plantes peuvent être cultivées, contenant l'information génétique unique et complète donnant aux plantes leurs caractéristiques individuelles et reliant les générations de plantes vivantes l'une à l'autre. Ainsi, les germoplasmes végétaux constituent un matériel brut pour la création de nouveaux types de plantes par amélioration conventionnelle ou par les techniques biotechnologiques. Un germoplasme d'agrumes peut être représenté par des graines, du pollen, du bois et dans certains cas des feuilles et d'autres organes végétatifs du genre *Citrus* ou des genres apparentés.

Depuis plusieurs années, les graines d'agrumes ont été considérées récalcitrantes parce qu'elles ne peuvent être conservées que durant de courtes périodes. Pour cela, les ressources génétiques d'agrumes sont maintenues sous forme d'arbres vivants dans des champs ou des collections protégées avec un coût élevé et un risque de perdre des génotypes suite aux aléas climatiques et biologiques. Durant les deux dernières décennies, la recherche a avancé des méthodes pour remédier au problème de conservation des ressources génétiques d'agrumes à long terme, tels que la culture de tissus (Engelmann, 1997), la cryoconservation des extrémités apicales des pousses (González-Arno *et al.*, 1988), des graines (Mumford et Grout, 1979; King *et al.*, 1981; Pérez, 1995), d'ovules (González-Arno *et al.*, 2003), d'embryons somatiques (González-Arno *et al.*, 2003) ou encore de cals embryogènes (Pérez *et al.*, 1999).

L'état des ressources génétiques d'agrumes et leur conservation ont été rapportés par Reuther (1977), the International Board for Plant Genetic Resources (1982), Albrigo (1997, 2001) et Broadbent *et al.* (1999), Rouse (1988) et Bettencourt *et al.* (1992). En dehors des centres d'origine et de diversité, les collections se composent essentiellement de variétés commerciales et de lignées améliorées (Krueger et Navarro, 2007). Ces collections sont de deux types : soit elles sont destinées à préserver à long terme la diversité des agrumes et des genres apparentés, soit elles constituent des parcs à bois pour approvisionner les agriculteurs et pépiniéristes en greffons de variétés commerciales (Ollitrault *et al.*, 1999). Ces dernières ne peuvent être strictement considérées comme des banques de germoplasmes vu le peu de variabilité qu'elles représentent. Par contre le premier type de collections a une mission spécifique de conserver les ressources génétiques pour la recherche agricole. Elles incluent des types non commerciaux d'agrumes du genre *Citrus* et d'autres genres et espèces au sein des *Rutaceae* (Krueger et Navarro, 2007). Parmi les collections les plus connues au monde la

collection de Beibei en Chine, qui présente actuellement un peu plus de 1000 accessions incluant 296 sélections locales et 116 sélections sauvages; au Nord-Est de l'Inde, une banque de gènes *in situ* est représentée par plus de 600 accessions; la collection de l'Okitsu Branch au Japon réputée la plus importante pour le matériel cultivé des zones d'origine; les collections de l'USDA aux Etats-Unis; celles de l'IVIA en Espagne; la station de l'INRA et du CIRAD de San Giuliano en Corse.

Un réseau global de gestion des ressources génétiques des agrumes est mis en place par la FAO en 1996 appelé 'The Global Citrus Germplasm Network (GCGN)' pour la conservation et l'utilisation de la diversité génétique des agrumes. Par ailleurs, la FAO, en collaboration avec le CIRAD et l'INRA, a élaboré le logiciel de gestion de bases de données du système EGID (**E**valuation et **G**estion **I**nformatique de la **D**iversité génétique) (Cottin *et al.*, 1995). Ce système permet la gestion et le stockage de toutes les informations botaniques et pomologiques disponibles et relatives à la collection d'agrumes composée de 1160 variétés, porte-greffes et cultivars du genre *Citrus*. Il est aussi basé sur le système des descripteurs pour les agrumes de l'IPGRI publié en 1988 (Cottin, 1999).

La gestion des ressources génétiques intraspécifiques peut se raisonner classiquement sous forme de *core collections*. Les résultats obtenus sur une collection d'une centaine de mandariniers témoignent de l'existence d'une forte structuration à l'échelle intraspécifique, qui pourrait permettre d'établir, pour partie, une stratégie d'échantillonnage sur la base des données moléculaires. Au contraire, les ensembles de caractères définissant les autres espèces cultivées -orangers, bigaradiers, pomelos, citronniers- reposent sur des génotypes qui ont une hétérozygotie relativement élevée mais qui sont stabilisés par la multiplication végétative. La conservation des ressources génétiques de chacune de ces espèces doit s'appuyer sur la constitution de collections de génotypes. Ces collections qui visent à conserver la plus large diversité adaptative et morpho-physiologique au sein de chaque "espèce", doivent en revanche permettre de proposer aux agrumiculteurs les cultivars les mieux adaptés aux différentes régions de production. Le marquage moléculaire n'apportant aucune information à ce niveau compte tenu des mécanismes d'évolution intraspécifique préalablement décrits, la stratégie d'échantillonnage doit se fonder principalement sur les critères géographiques et sur les données agro-morphologiques (Ollitrault *et al.*, 1999). Une étude récente s'est proposé de tester la transférabilité et le polymorphisme de 526 paires d'amorces microsatellites, développées à partir de BAC End séquences de clémentine, chez le genre *Citrus*. Cette étude a révélé un polymorphisme important aussi bien au niveau intra- qu'interspécifique. Ces

microsatellites développés serviront pour l'analyse de la diversité génétique (incluant les espèces sauvages), pour la cartographie de génétique comparative interspécifique, et pour l'intégration de cartes de génétique de liaison et physique chez les agrumes. Ceci aidera à décrypter la structure mosaïque interspécifique des agrumes cultivés et leur évolution (Ollitrault *et al.*, 2010).

4-2- Les marqueurs moléculaires

Les marqueurs moléculaires sont largement utilisés dans le génotypage du matériel végétal pour des divers objectifs. Les généticiens les utilisent pour marquer des gènes majeurs, cartographier des QTLs et étudier la génétique des populations. Les sélectionneurs les appliquent pour caractériser et gérer les ressources génétiques, suivre des caractères d'intérêt dans des programmes d'hybridation, et identifier les variétés pour la certification et la protection des obtentions. En général, deux classes de marqueurs ont été identifiées : les marqueurs co-dominants, de ce fait l'hétérozygote est distingué des deux homozygotes, parmi ces marqueurs : RFLP, CAPS et SSRs et les marqueurs dominants avec lesquels l'hétérozygote est identique à l'homozygote, parmi ces marqueurs plusieurs sont basés sur la PCR: RAPDs, ISSRs et AFLPs. Chaque type de marqueur repose sur une méthodologie qui va conditionner la nature de l'information obtenue. Pour cela les marqueurs ont aussi été classés selon ceux dits multialléliques (RFLP, SSRs), qui permettent de révéler une série de plusieurs allèles pour chaque locus étudié, et ceux de type (RAPD, AFLP) qui permettent de révéler la présence ou l'absence d'un seul allèle pour chaque locus, et cela simultanément pour un grand nombre de locus, ce sont les marqueurs de type empreinte génétique, ou *fingerprinting* (Grivet et Noyer, 1999).

4-2-1 Les microsatellites

Les séquences microsatellites ou SSRs sont constituées de courtes répétitions en tandem de séquence d'ADN (1 à 6 paires de base) qui sont dispersées dans tous les génomes Eucaryotes (Tóth *et al.*, 2000) mais également dans le génome de certains chloroplastes et de quelques mitochondries. Ces répétitions sont retrouvées à la fois dans les régions codantes, mais plus fréquemment dans celles non codantes du génome (Kashi *et al.*, 1997). Les marqueurs microsatellites ont gagné une importance considérable en génétique et amélioration des plantes grâce à leurs caractéristiques génétiques favorables incluant un polymorphisme élevé, à titre indicatif, les taux de mutation mesurés expérimentalement sont de l'ordre de 10^{-2} à 10^{-6} par kb. Ces taux de mutation élevés sont expliqués par le fait que lors de la réplication, la

polymérase glisse sur ces motifs répétés et dérape en introduisant des erreurs de réplication. Ces régions étant souvent non codantes, aucune contrainte sélective n'élimine le nouveau variant (Harry, 2001). Il s'agit d'un polymorphisme de *nombre d'unités de répétitions*.

Outre leur polymorphisme extrêmement élevé, les microsatellites sont largement distribués dans le génome, codominants, reproductibles permettant les activités en réseau, multi-alléliques, et permettent de développer des marqueurs mono-locus (Parida *et al.*, 2009). Un motif microsatellite donné n'est pas spécifique d'un locus; en revanche, les séquences flanquantes le sont. Une paire d'amorces oligonucléotidiques spécifiques de ces régions bordantes, permettra grâce à la PCR, d'amplifier ce seul locus microsatellite et de disposer ainsi d'un marqueur microsatellite ou SSR (de Vienne, 1998; Santoni *et al.*, 2000).

Plusieurs stratégies ont été proposées pour isoler les microsatellites (Zane *et al.*, 2002). Depuis les dernières décennies, le développement de marqueurs microsatellites à partir de banques de données issues du séquençage de génomes entier (Grover *et al.*, 2007), ESTs (Luro *et al.*, 2006) ou de gènes uniques (UGMS) (Sharma *et al.*, 2009) s'est substitué à des processus plus laborieux d'isolation à partir de banques génomiques (Aishwarya *et al.*, 2007).

Les SSRs ont prouvé qu'ils constituent des marqueurs génétiques efficaces pour la cartographie génétique. Récemment, une carte génétique à haute densité chez le tabac (*Nicotiana tabacum* L.) a été générée à partir d'une large gamme de marqueurs microsatellites nouvellement développés (Bindler *et al.*, 2011). Par ailleurs, les microsatellites des plantes ont été développés pour la conservation de germoplasme, l'identification de cultivars et pour l'évaluation de la diversité génétique non seulement chez les cultures comme le maïs (Van Inghelandt *et al.*, 2010), le riz (Jin *et al.*, 2010), le haricot commun (Burle *et al.*, 2010), la tomate (He *et al.*, 2003a), l'arachide (He *et al.*, 2003b; Ferguson *et al.*, 2004), le manioc (Sardos *et al.*, 2008), l'aubépine (Lo *et al.*, 2010), le sorgho (Mutegi *et al.*, 2011), mais aussi chez marijuana (Alghanim et Almirall, 2003) et les plantes pérennes comme le pin (Kutil et Williams, 2001), le *Lichi* (Viruel et Hormaza, 2004) et l'Eucalyptus (Kirst *et al.*, 2005). Aussi les marqueurs SSRs pourraient être de grande valeur pour l'amélioration génétique puisqu'ils ont permis la classification de germoplasme tel que celui du panic érigé (*Panicum virgatum* L.), une classification par écotype, ploïdie, pools génétiques et cultivar (Zalapa *et al.*, 2011).

Chez le genre *Citrus* et genres apparentés, les microsatellites ont été développés à partir de banques génomiques (Kijas *et al.*, 1995; Ahmad *et al.*, 2003; Novelli *et al.*, 2006; Froelicher *et al.*, 2008), ESTs (Bausher *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2008; Luro *et al.*, 2008) et séquences

BACend (Terol *et al.*, 2008; Ollitrault *et al.*, 2010). Ces marqueurs se sont montrés très utiles dans l'évaluation de la diversité génétique chez les agrumes en plus des observations phénotypiques (Corazza-Nunes *et al.*, 2002; de Oliveira *et al.*, 2002 ; Pang *et al.*, 2003; Golein *et al.*, 2005; Barkley *et al.*, 2006). Cependant, il demeure encore difficile d'identifier la variabilité intraspécifique chez certaines espèces d'agrumes.

4-2-2 Les SNPs

Les SNPs sont les formes les plus abondantes de variation génétique parmi les individus au sein des espèces (Rafalski, 2002). Il s'agit de mutations ponctuelles qui substituent une base par une autre dans le génome, où l'abondance de l'allèle le moins fréquent est de 1% ou plus (Brookes, 1999). Chez le maïs (*Zea mays*) par exemple, dans 18 gènes analysés chez 36 lignées consanguines, la fréquence de variation d'un nucléotide parmi les variétés est élevé, aux alentours d'un polymorphisme par 31bp dans les régions non-codantes, et d'un polymorphisme par 124pb dans les régions codantes (Ching *et al.*, 2002). Pour la même espèce, considérée hautement polymorphe, Tenaillon *et al.* (2001) ont rapporté une moyenne d'un SNP toutes les 104 pb, alors que chez le soja, espèce autofécondée, Zhu *et al.* (2003) ont trouvé un SNP toutes les 273 pb.

Certains auteurs considèrent les polymorphismes d'insertion/délétion (*indel*) comme des SNPs, élargissant ainsi la définition (Hoskins *et al.*, 2001). Les *indel* sont aussi fréquents dans les régions non-codantes (une par 85 bp), mais rares dans les régions codantes (Ching *et al.*, 2002). Ces marqueurs présentent en général deux allèles différents et sont co-dominants. Les SNPs se trouvent fréquemment dans ou près des séquences codantes (Cho *et al.*, 1999) et pourraient être la cause de différences fonctionnelles entre allèles.

La raison principale qui explique la grande popularité des SNPs dans l'analyse génétique est qu'ils sont présents en grand nombre, qu'ils ont un faible taux de mutation, en plus, ils sont mieux répartis dans le génome que les microsatellites, augmentant la possibilité de trouver des marqueurs proches des locus d'intérêt. Beaucoup de marqueurs SNPs hautement polymorphes et informatifs ont été identifiés chez plusieurs espèces dont *Arabidopsis* (Schmid *et al.*, 2003), le maïs (Mammadov *et al.*, 2010), le coton (Shaheen *et al.*, 2010), le riz (Goff *et al.*, 2002; McCouch *et al.*, 2010), le fraisier des bois (Ruiz-Rojas *et al.*, 2010), l'amandier (Silva *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2008) et chez le gommier rose (*Eucalyptus grandis*) (Novaes *et al.*, 2008). Le récent développement de méthodes de génotypage à très haut débit et la réduction des coûts

n'est pas étranger au succès des SNPs (Bhatramakki *et al.*, 2002; Syvänen, 2005; Chagné *et al.*, 2012).

Les SNPs sont considérés comme la nouvelle génération des marqueurs moléculaires pour de nombreuses applications (Rafalski, 2002; Ayeh, 2008) comme la construction des cartes de liaison génétiques (Rafalski, 2002; Batley et Edwards, 2007), la découverte de gènes/QTLs, l'évaluation de la diversité génétique (van Tienderen *et al.*, 2002; Giancola *et al.*, 2006; Cortés *et al.*, 2011), la vérification de pedigree, l'identification de cultivars, les études d'association (Ohnishi *et al.*, 2001), et l'amélioration assistée par marqueurs (Shi *et al.*, 2011). Des séquences BACend de génotypes hétérozygotes ont été utilisées avec succès dans la découverte de SNPs et la construction de cartes de liaison (Weil *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2006; Ollitrault *et al.*, 2012a).

Ces marqueurs peuvent être utilisés dans des programmes d'amélioration assistée par marqueurs. Aussi, des marqueurs SNPs couplés aux SSRs ont été appliqués pour étudier la structure de population et la diversité génétique du maïs (Van Inghelandt *et al.*, 2010). Par ailleurs, une autre étude récente a évalué les effets du nombre de SNPs et de la stratégie de sélection sur l'estimation de la diversité génétique et de la structure de population pour différents types de cultivars et de *landraces* (orge local) d'orge (Moragues *et al.*, 2010).

Les SNP sont utilisés pour l'identification de gènes associés à des loci de caractères spécifiques. Grâce à la disponibilité des séquences génomiques annotées à partir de plusieurs espèces modèles et des applications de la technologie génomique (séquençage, génotypage, profil d'expression génique, génomiques comparatives, bioinformatiques, analyse de liaison, mutagenèse et biochimie), un grand nombre de séquences de gènes candidats pour divers traits complexes est maintenant disponible pour les analyses d'association (Zhu *et al.*, 2008). Toutes ces technologies avancées rendent accessibles l'identification de centaine de milliers de SNPs en reséquençant une collection de référence de diverses lignées et en génotypant ces SNPs à travers un large nombre d'échantillon. A titre d'exemples, chez le blé, des études de variations de séquences sur des gènes d'intérêt comme *puroindoline b* (Giroux et Morris, 1997), ou les gènes candidats liés à la synthèse des protéines de stockage (Guillaumie *et al.*, 2004; Ravel *et al.*, 2007), ont permis la découverte de SNPs qui ont été utilisés pour des études d'association génotype/phénotype. Le pin à l'encens (*Pinus taeda* L.) a fait l'objet d'analyse d'association entre la variation allélique de 58 SNPs à partir de 20 gènes candidats

liés au bois et à la sécheresse et une panoplie de traits liés aux propriétés du bois à importance évolutionniste et commerciale (González-Martínez *et al.*, 2006).

Chez les agrumes, des SNPs ont été identifiés par séquençage ciblés (10 fragments) chez 58 accessions du genre *Citrus*, hybrides et genres apparentés (Novelli *et al.*, 2004). Des séquences génomiques d'orange douce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) ont été utilisées pour définir des amorces et sélectionner les STSs pour l'identification des SNPs. Cette étude a montré le grand potentiel des marqueurs SNPs dans les programmes d'amélioration et de caractérisation ainsi que les études phylogénétiques. Récemment 622 SNPs (sur 1457 testés parmi 6617 (1.08 SNP/kb) publiés par Terol *et al.*, 2008) identifiés dans des BACend de clémentinier ont été transférés avec succès sur l'ensemble du genre *Citrus* et on a permis de confirmer certaines hypothèses et d'en formuler d'autres sur l'origine des formes cultivées (Ollitrault *et al.*, 2012a), d'établir la carte génétique de référence du Clémentinier et de servir de bases à des études de cartographie génétique comparative (Ollitrault *et al.*, 2012b). La mise à disposition prochaine de la séquence de référence complète du génome des agrumes et les nombreux reséquençages de variétés actuellement réalisés par NGS vont très prochainement constituer une source inestimable pour l'identification de gènes associés aux variations phénotypiques.

4-3- Génétiques moléculaires et étude de la diversité génétique

Les génétiques moléculaires incluent toutes les activités relatives à l'amélioration génétique des agrumes basées sur l'utilisation des techniques moléculaires qui manipulent les gènes au niveau d'acides nucléiques (ADN ou ARN). En d'autres termes, elles incluent les efforts liés aux sciences génomiques reliant l'information génétique sur des traits phénotypiques importants à la compréhension moléculaire de la structure et de la fonction des gènes. Ceci fournira la base pour une manipulation plus précise et spécifique des caractéristiques de l'arbre et des fruits (Gmitter *et al.*, 2007). Le polymorphisme issu de ces marqueurs génétiques est directement interprétable en termes de variations alléliques. Les nouveaux outils permettent de réaliser le marquage de l'ensemble du génome et donc, par l'analyse des taux de recombinaison sur des descendance contrôlée, de localiser les gènes déterminant les caractères monogéniques ainsi que les gènes majeurs contrôlant la variance génétique des caractères quantitatifs (QTL) (Ollitrault et Luro, 1995; García *et al.*, 2000). Plusieurs cartes du génome des agrumes associant isoenzymes, RFLP et RAPD ont été publiées (Durham *et al.*, 1992; Jarrel *et al.*, 1992; Cai *et al.*, 1994; Luro *et al.*, 1994, 1996; De Simone *et al.*, 1998;

Cristofani *et al.*, 1999; Roose, 2000; Gulsen *et al.*, 2010). Les travaux de cartographie du génome ont mis en évidence de très nombreuses distorsions de ségrégation (Luro *et al.*, 1995) et ont en particulier, permis de localiser dans le génome du *Poncirus* le gène dominant d'immunité à la Tristeza (Gmitter *et al.*, 1996; Cristofani *et al.*, 1999; Cristofani et Machado, 2000; Rai, 2006) et un gène de nanisme identifié chez *Poncirus trifoliata* cv. Flying Dragon (Cheng *et al.*, 1995). Des études réalisées visaient l'induction (Zhang *et al.*, 2005), l'identification et l'analyse de l'expression de gènes régulateurs de froid à partir de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. (Sahin-çevik et Moore, 2006). D'autres approches associant génomique et physiologie (ESTs, DDRT-PCR, banques génomiques cDNA, banques soustractives, caractérisation du transcriptome...) permettent d'identifier directement des gènes impliqués ou potentiellement impliqués (gènes candidats) dans l'expression d'un caractère. Plusieurs recherches ont été réalisées au sein de ce volet à savoir l'analyse des ESTs d'agrumes à partir de banques cDNA (Terol *et al.*, 2005), ou l'extraction de microsatellites à partir d'ESTs d'agrumes (Chen *et al.*, 2006), Le projet de séquençage d'ESTs générés à partir de clones ADNc de banque complète de *C. sinensis* (Bausher *et al.*, 2003), l'analyse de l'expression de gènes à un stade de développement jeune fruit de mandarine Satsuma (Boo *et al.*, 2007).

Un projet espagnol "*Citrus Functional Genomics Project (CFGP)*

(<http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB/index.html>) a été conduit avec pour objectif le développement d'outils génomiques à partir d'études de génomiques fonctionnelles pour différents aspects de la production et de la qualité des fruits (croissance végétative, floraison, maturation et fructification), réponses aux stress biotiques (champignons, virus et viroïdes) et abiotiques (sécheresse, salinité et déficience ferrique des sols).

Plus largement, l'utilisation des marqueurs moléculaires a servi à: l'identification des plantules nucellaires et zygotiques (SSR et AFLP: Scarano *et al.*, 2003; SSRs: Ruiz *et al.*, 2000; ISSR-PCR: Tusa *et al.*, 2002; RAPD et EST-SSR: Rao *et al.*, 2008; Andrade-Rodríguez *et al.*, 2004), la caractérisation génétique du genre *Citrus* et des cultivars d'agrumes (RFLP : Liou *et al.*, 1996; AFLP: Campos *et al.*, 2005; RFLPs, ISSR : Fang *et al.*, 1997; IRAP, ISSR, RAPD : Bernet *et al.*, 2004; ISSR : Fang et Roose, 1997; Ahmad *et al.*, 2003; Capparelli *et al.*, 2004; Golein *et al.*, 2005; Barkley *et al.*, 2006; Novelli *et al.*, 2006; Shahsavari *et al.*, 2007; Froelicher *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2010; RAPD, SSR : Corazza-Nunes *et al.*, 2002; ISSR, RAPD : De Pasquale *et al.*, 2006), la comparaison du niveau de polymorphisme au sein de collections avec différentes sources de variation ou d'hybrides somatiques (Bretó *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2002; Scarano *et al.*, 2002; Fu *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2004; Orbović *et al.*,

2008), l'analyse de l'origine de nouveaux hybrides tétraploïdes ($2n=4x$) (Ferrante *et al.*, 2010) et caractérisation d'hybrides somatiques (Cheng *et al.*, 2003; Khan et Grosser, 2004; Guo *et al.*, 2006), la cartographie du génome chez les agrumes et l'extension des cartes de liaison génétiques (Durham *et al.*, 1992 ; Jarrel *et al.*, 1992; Luro *et al.*, 1994; Kijas *et al.*, 1997; Roose, 2000; Sankar et Moore, 2001; Luro *et al.*, 2003; de Oliveira *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Bernet *et al.*, 2010; Gulsen *et al.*, 2010; Ollitrault *et al.*, 2012a), l'analyse de l'origine des agrumes cultivés, l'évaluation des relations génétiques au sein du genre *Citrus*, et le décryptage de la structure inter et intraspécifique de la diversité génétique des agrumes cultivés (Fang *et al.*, 1998; Federici *et al.*, 1998; Nicolosi *et al.*, 2000; Luro *et al.*, 2001; Moore, 2001; de Araújo *et al.*, 2003; Lotfy *et al.*, 2003; Jung *et al.*, 2005; Pang *et al.*, 2007; Kyndt *et al.*, 2010 ; Garcia-Lor *et al.*, 2012, 2013; Ollitrault *et al.*, 2012a). Par ailleurs, les cartographies génétiques comparatives réalisées au niveau intragénérique (Bernet *et al.*, 2010; Ollitrault *et al.*, 2012a) et intergénérique (*Citrus/Poncirus* ; Chen *et al.*, 2008) ont permis d'étudier la colinéarité entre les cartes de liaison des espèces concernées et la distribution génomique des régions de distorsion de ségrégation.

Aujourd'hui se développent, sur les agrumes, de grands programmes de génomique à l'échelle internationale qui devraient déboucher sur des connaissances et des outils de sélection précoce permettant d'accroître considérablement l'efficacité des programmes de création variétale. Nouvelle discipline qui a émergé dans le prolongement du décryptage des génomes, la génomique fonctionnelle vise à caractériser la fonction de chaque gène et reconstituer la nature des réseaux moléculaires responsables des fonctions biologiques. Pour cela, cette discipline s'appuie sur les technologies les plus récentes et des bioinformatiques.

V- Intérêt des porte-greffes pour répondre aux contraintes du Bassin Méditerranéen

5-1- Apport du porte-greffe

Depuis la moitié du XIX^{ème} siècle, l'utilisation de porte-greffe est devenue systématique en agrumiculture suite aux dégâts provoqués par la gommose à *Phytophthora* sur les agrumes cultivés franc de pied. Les porte-greffes offrent d'autres avantages:

1/ Les plants issus de semis ont généralement une période juvénile prolongée (3 à 15 ans selon les espèces), et maintiennent des caractères juvéniles indésirables (comme des épines excessivement larges).

2/ La propagation par greffage sur un porte-greffe garantie la production de fruits à l'identique à la source du bourgeon permettant ainsi des plantations de type uniforme.

3/ La plupart des porte-greffes sont apomictiques, ce qui peut produire des plantes uniformes à partir de graines à bas prix, en comparaison avec le bouturage ou la culture de tissus.

4/ L'association scion/porte-greffe permet de combiner les meilleures caractéristiques génétiques du fruit (qualité et quantité), avec les traits génétiques les plus forts des racines (adaptation au type de sol, tolérance à la salinité, résistance aux maladies et nématodes...) (Khan et Kender, 2007). Une telle combinaison des traits génétiques en un seul génotype franc de pied serait considérablement plus difficile à obtenir.

Les porte-greffes doivent : **1/** assurer l'adaptation des agrumes aux différents contextes pédoclimatiques permettant ainsi d'élargir l'aire de culture d'une espèce fruitière hors de sa zone de prédilection dès lors que certaines conditions deviennent limites (stress biotiques et abiotiques...). **2/** Apporter des résistances à de nombreux agents pathogènes (*Phytophthora* sp., Tristeza, nématodes, mal secco...). Leurs interactions avec les cultivars déterminent également la qualité des fruits qui constituent un facteur de sélection très important, particulièrement pour les productions destinées au marché frais.

Cependant, l'utilisation de porte-greffe n'a pas que des intérêts. En effet, **1/** le greffage nécessite une certaine expertise et plus de frais à comparer avec la propagation par graines. **2/** Une lignée de porte-greffe peut produire un mélange de plants nucellaires et zygotiques ce qui demande un travail de sélection pour assurer l'uniformité des porte-greffes à retenir. **3/** Plusieurs pathogènes et maladies sont transmissibles par greffage. **4/** Un problème important associé à l'utilisation d'un porte-greffe est l'incompatibilité potentielle du greffage entre certains porte-greffes et scions. Un tel conflit entre la physiologie du porte-greffe et le scion peut causer une croissance faible ou la mort de l'arbre. **5/** Un porte-greffe est susceptible d'affecter des traits du scion qu'il porte, comme la taille de l'arbre, la productivité et la qualité des fruits. Par exemple, le porte-greffe Rough lemon (*C. jambiri*) qui donne des arbres vigoureux et très productifs, mais les scions greffés sur Rough lemon produisent peu de fruits à faible taux en sucre (Khan et Kender, 2007).

Des études ont utilisé des variétés d'orange (*C. sinensis* Osbeck.) comme porte-greffe intermédiaire "*interstock*", greffées entre le porte-greffe bigaradier (*C. aurantium* L.) et le

scion citronnier (*C. limon* (L.) Burm.). Les résultats ont montré que cette combinaison accroît non seulement la croissance de l'arbre, sa longévité, la production des fruits et leur qualité (Gil-Izquierdo *et al.*, 2004), mais augmente la tolérance au sel chez les arbres de citronnier par la réduction des degrés de Cl^- et Na^+ dans les feuilles (Cámara Zapata *et al.*, 2003; Gimeno *et al.*, 2009).

5-2- Critères de choix d'un porte-greffe

Les qualités essentielles d'un bon porte-greffe peuvent être résumées comme suit :

- Une bonne résistance à la gommose à *Phytophthora*, principale maladie cryptogamique qui affecte les tissus conducteurs de sève des racines et du tronc.
- Une association greffon/porte-greffe tolérante à la maladie à virus de la Tristeza.
- Une adaptation aux sols alcalins et à teneurs souvent élevée en sels.
- Une multiplication et un élevage en pépinière facile ainsi qu'une bonne affinité au greffage avec les principales espèces et variétés commerciales.
- Un effet favorable du porte-greffe sur le greffon, se traduisant en particulier par une mise à fruit rapide et une meilleure qualité des fruits, aussi bien en matière de calibre qu'en matière de qualité organoleptique et teneur en jus.

Il est évident que le porte-greffe idéal rassemblant toutes ces qualités n'existe pas. Les critères de sélection des porte-greffes doivent tenir compte d'un certain nombre de contraintes et d'effets sur les variétés en permettant une multiplication à l'identique, ayant un système racinaire adapté et offrant une bonne affinité porte-greffe/variété. Le choix d'un porte-greffe doit être basé sur les facteurs limitant les plus importants à la production dans une région donnée, le climat local, les conditions du sol, le cultivar et le but de la production de la culture (produit frais ou transformé).

Parmi plusieurs autres facteurs majeurs, la combinaison particulière porte-greffe/scion détermine ou modifie la taille du fruit ainsi que ses qualités externes et internes et son aptitude à la conservation (Ladaniya, 2008). Plusieurs études ont été réalisées pour évaluer plusieurs combinaisons porte-greffes/greffons ainsi que leurs effets sur le rendement et la qualité des fruits (Georgiou, 2002; Stuchi *et al.*, 2002; Forner-Giner *et al.*, 2003; Zekri et Al-Jaleel, 2004; Al-Jaleel *et al.*, 2005; Perez-Perez *et al.*, 2005; Ramin et Alirezanezhad, 2005; Louzada *et al.*, 2008).

Sur plusieurs dizaine d'années, plusieurs groupes de recherche ont testé des porte-greffes, des hybrides et des scions de variétés sous une large gamme de conditions expérimentales impliquant des traitements au sel (Zekri et Parsons, 1989; Lloyd *et al.*, 1990; Chen, 1992; Zekri, 1993; Garcia-Lidon *et al.*, 1998; Mouloud *et al.*, 2002; Rochdi *et al.*, 2005), ou des sols calcaires et à pH élevé (Louzada *et al.*, 2008). Hélas, les porte-greffes disponibles comme l'orange trifolié et ses hybrides les citranges Carrizo et Troyer et qui sont résistants à plusieurs stress biotiques (*CTV*, nématodes, *Phytophthora* spp.), sont sensibles à un degré élevé en calcium mais aussi au stress salin. Les porte-greffes appartenant au groupe des citronniers sont tolérants à la salinité mais sensibles aux *CTV*, nématodes et *Phytophthora* spp. De plus, le mandarinier Cléopâtre, qui est très tolérant au sel et à la tristeza est sensible à *Phytophthora* spp. Pour cela, il est incontestable que l'objectif principal des améliorateurs serait de chercher et de créer de nouveaux porte-greffes cumulant les deux types de tolérance aux stress biotique (tristeza, *Phytophthora* spp., Nématodes) et abiotique (salinité, alcalinité), tout en octroyant à la variété une bonne qualité des fruits et une bonne productivité.

5-3- Les principaux porte-greffes des agrumes

Les caractéristiques horticoles importantes des principaux porte-greffes à travers le monde sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3. Caractéristiques des porte-greffes importants d'agrumes

(Davies et Albrigo, 1994)

Caractéristiques	Tolérance à <i>Phytophthora</i>	Tolérance à la Tristeza	Tolérance à l'exocortis	Tolérance à la cachexie- xyloporose	Tolérance aux nématodes des agrumes	Tolérance aux nématodes foreurs des racines	Tolérance à la salinité	Tolérance à la sécheresse	Tolérance aux gelées	Tolérance au calcium élevé	Calibre des fruits	Vigueur de l'arbre	Rendement/arbre
Porte-greffe													
Bigarade	R	S (en combinaison)	T	T	S	S	I	I	B	E	I	I	I
Citrange Carrizo	T	T	S	T	T	T	F/S	B	I	F	I	E	E
Citrange Troyer	R	T	S	T	R	S	I	I	B	I	I	I	E
Orange trifoliée	TR	R	S	T	R	S	F/S	F	B	F/S	P	F	F/I
Mandarinier Cléopâtre	S	T	T	T	S	S	B	I	B	I	P	E	F/I
<i>Citrus volkameriana</i>	S	T	R	T	S	S	I	B	F	E	G	E	E
Rough lemon	S	T	T	T	S	S	I	B	F	E	G	E	E
<i>Citrus macrophylla</i>	R	S	T	S	S	S	B	B	F	E	G	E	E
Citrumelo swingle	T	T	S	T	T	S	F	B	I	F	I	E	E
Lime Rangpur	S	T	S	S	S	S	B	B	F	E	G	E	E
Orange douce	S	T	T	T	S	S	I	F	I	F	I	I	I
Lime douce de Palestine	S	T	S	S	S	S	F	B	F	I	G	E	E

Abréviations : B = bonne; E = élevé; I = intermédiaire; F = faible; G = grand; TR = très résistant; R = résistant; S = sensible; T = tolérant; P = petit.

5-4- Le bigaradier

Le bigaradier (*Citrus aurantium* L.) est originaire du Sud-Est d'Asie. Webber *et al.* (1967) considèrent que les bigaradiers pourraient avoir été emmenés au Bassin Méditerranéen après les conquêtes des arabes ; durant le 10^{ème} siècle en Perse, Iraq, Syrie, Palestine et Egypte et plus tard en Nord de l'Afrique, Sicile, Sardaigne et Espagne (Nicolosi, 2007). Dans la littérature arabe ancienne (cités par Tolkowski, 1938; Calabrese, 1998), le terme '*naranji*'

désignait le bigaradier ; aussi, plusieurs autres nominations lui ont été données: *Citrus vulgaris* (Risso, 1813), *Citrus bigaradia* (Risso et Poiteau, 1818). *Citrus aurantium* L. est le binomial scientifique adopté après la description fournie par Linneus en 1753. Ce dernier a placé l'orange comme une variété de bigaradier, en la nommant *C. aurantium* var. *sinensis*.

La bigarade est très utilisée en médecine et en parfumerie. Elle est appréciée pour son écorce à l'odeur fortement poivrée, son parfum d'une exquise suavité et sa fleur blanche odorante qui sert à obtenir l'huile essentielle ou néroli, par distillation.

Grâce à ses qualités d'adaptation à une large gamme de types de sols et l'excellente qualité de fruits qu'il confère, le bigaradier (*C. aurantium* L.) est le porte-greffe le plus anciennement utilisé dans le monde, encore prédominant en Méditerranée (Grosser *et al.*, 2004).

Le bigaradier présente l'avantage :

- D'avoir un bon comportement en pépinière,
- D'être relativement tolérant aux chlorures,
- D'être assez tolérant au calcaire,
- De s'adapter à une large gamme de types de sols,
- D'avoir une bonne affinité avec toutes les variétés sauf les kumquats et les Satsuma,
- D'être tolérant à l'Exocortis,
- D'être résistant à la gommose (*Phytophthora*),
- De conférer une qualité de fruit acceptable avec une productivité moyenne.

Par contre,

- Il craint l'excès d'eau et les sols lourds,
- Il est sensible aux nématodes,
- Avec un calibre des fruits plutôt moyen à petit,

Par ailleurs, le principal inconvénient de ce porte-greffe est sa sensibilité au virus de la tristeza quand il est utilisé comme porte-greffe pour les variétés d'orange ou de pamplemousse (Rao *et al.*, 2008). Pour cela, l'emploi du bigaradier est limité et réglementé pour un petit nombre de régions dans le monde. Suite à ceci, s'impose le remplacement de ce porte-greffe par d'autres, afin d'intégrer plus de tolérance au CTV et à la salinité, qui est fréquemment omniprésente dans la plupart des régions où on cultive les agrumes. Le bigaradier a fait l'objet de plusieurs travaux visant l'amélioration des porte-greffes. A partir de cultures d'ovules, 17

lignées de cals ont été générées; le bigaradier étant l'un des géniteurs potentiels. Ces cals ont présenté un intérêt potentiel pour la sélection de porte-greffes (Ollitrault *et al.*, 1998).

5-5- Les objectifs d'amélioration des porte-greffes pour le Bassin Méditerranéen et la Tunisie

L'amélioration des porte-greffes d'agrumes ont un objectif commun celui de créer des porte-greffes résistants ou tolérants aux ravageurs et aux maladies, d'augmenter leur adaptabilité aux différents sols et conditions environnementales, de donner aux scions un rendement élevé, une qualité et taille des fruits supérieures. Le 1^{er} objectif d'amélioration des porte-greffes est l'adaptation aux conditions et aux parasites. Les besoins les plus courants seraient de combiner les caractères de tolérance aux stress biotiques (essentiellement *CTV* et *Phytophthora* sp.) et abiotiques (alcalinité/salinité/sécheresse). D'autres objectifs importants incluent la tolérance au mal secco, qui réduit la survie en pépinière des porte-greffes sensibles et la tolérance à la chlorose ferrique associée aux sols calcaires (Ollitrault et Navarro, 2012). L'amélioration des porte-greffes qui permet une meilleure gestion des maigres ressources en eau constitue un défi majeur pour le Bassin Méditerranéen, dont la Tunisie.

Des particularités intéressantes de tolérance aux stress biotique et abiotique sont présentes chez les agrumes et leurs proches. Des progéniteurs complémentaires peuvent être identifiés, surtout au sein du genre *Poncirus*, d'une part pour la résistance aux maladies, et d'autre part au sein du genre *Citrus* pour l'adaptation au stress abiotique (Dambier *et al.*, 2011).

VI- Les méthodes d'amélioration des porte-greffes d'agrumes

L'accroissement des pressions phytosanitaires et la diversification variétale effectuée sur des critères de qualité attendue par le marché sont deux des justifications majeures des programmes d'amélioration des agrumes à travers le monde. Comme pour les variétés, toutes les industries mondiales d'agrumes profiteront des améliorations génétiques conduisant au développement de nouveaux cultivars de porte-greffes (Gmitter *et al.*, 2007).

Le tableau suivant résume les objectifs les plus recherchés par les améliorateurs des porte-greffes d'agrumes (Tableau 4).

Tableau 4. Les objectifs communément considérés pour l'amélioration des porte-greffes
(Khan & Kender, 2007)

Apomixie
Productivité améliorée
Réduction de la taille de l'arbre
Adaptation aux conditions du sol (salinité, calcaire du sol)
Amélioration de la nutrition pauvre
Résolution de problèmes de formation des bourgeons
Résistance aux maladies (<i>Phytophthora</i> , <i>Citrus Tristeza Virus</i> , Citrus Blight...)
Résistance aux pathogènes du sol (diaprepes, nématodes...)
Amélioration de la qualité du fruit
Production élevée de graines

6-1- L'amélioration conventionnelle

En s'appuyant sur la multiplication végétative, les améliorateurs se sont limités, la plupart du temps et jusqu'à récemment, à une sélection clonale basée sur l'identification de mutations spontanées. Ainsi, l'essentiel de leurs efforts ont été portés sur les techniques de recherche ou d'induction de polymorphisme sur un seul cycle.

Typiquement, le temps pour qu'un porte-greffe créé par hybridation croisée, est prêt pour la commercialisation, varie de 30 à 35 ans. Les premiers programmes de création variétale par hybridation entrepris dans le monde occidental l'ont été en 1893 par Swingle et Webber à l'USDA en Floride (Swingle et Webber, 1898). Ils étaient orientés pour un premier temps vers la recherche de résistance aux maladies et au froid. *Poncirus trifoliata* a largement été utilisé comme parent pour générer des porte-greffes hybrides intergénériques comme les Citranges Troyer et Carrizo (*Citrus sinensis* (L.) Osb. X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.). Le porte-greffe Citrange C35 (*Citrus sinensis* 'ruby blood' x *Poncirus trifoliata*) est issu du programme d'amélioration de l'université de Californie en 1986 (Soost et Roose, 1996). D'autres hybrides *Poncirus* X *Citrus* se sont avérés de très bons porte-greffes comme certains Citrumellos (*Poncirus* X Pomélo) dont le *Citrumello swingle* (Pomélo *C. paradisi* Macf. X orange trifoliée hybride *poncirus trifoliata* (L.) Raf.).

Cependant, mis à part le développement de tels hybrides, peu de cultivars résultent de programmes de reproduction conventionnelle d'agrumes. En effet, l'amélioration par voie sexuée s'est longtemps heurtée aux contraintes spécifiques du système de reproduction des agrumes. Sachant que la polyembryonie conduit à l'obtention, dans les semis, d'une proportion élevée de plants nucellaires possédant le génotype maternel, ceci limite les

recombinantes et donc la probabilité d'obtenir des génotypes élités par hybridation entre cultivars polyembryonnés. Cette contrainte a réduit significativement la base génétique exploitée en conduisant les améliorateurs à ne retenir généralement que des géniteurs femelles monoembryonnés. D'autres limites à l'amélioration conventionnelle incluent l'auto-incompatibilité gamétophytique, la faible fertilité des hybrides intergénériques, la longueur de la phase juvénile et l'encombrement des descendance, la méconnaissance du déterminisme génétique de la plupart des caractères (Iwamasa *et al.*, 1988; Ollitrault et Luro, 1995).

6-2- L'apport des biotechnologies

6-2-1- Hybridation somatique

L'apport des biotechnologies s'est manifesté principalement par l'utilisation de l'hybridation somatique ou fusion de protoplastes. L'hybridation somatique permet d'accroître la diversité des pools géniques des espèces cultivées, non seulement en contournant les incompatibilités ou contraintes sexuelles, mais également en combinant les génomes nucléaires, chloroplastiques et mitochondriaux suivant de nouveaux modèles. L'hybridation somatique est une alternative pour la création de nouveaux porte-greffes qui a fait ses preuves, en permettant l'addition de deux génomes et la combinaison des gènes de résistance des deux parents (Grosser *et al.*, 2000; Ollitrault *et al.*, 2007b; Mourão Filho *et al.*, 2008). Une combinaison qui peut rassembler des caractères de tolérance aux stress abiotiques (salinité) et de résistance à des pathogènes comme le *CTV* et *Phytophthora* spp. ou encore la résistance aux insectes, l'adaptation au sol et le contrôle de la taille de l'arbre (Ollitrault *et al.*, 1998; Ollitrault *et al.*, 2000b; Guo *et al.*, 2002; Grosser et Chandler, 2003). De nouvelles techniques de propagation ont été proposées pour l'évaluation d'hybrides somatiques qui pourraient être utilisés comme porte-greffes (Pio *et al.*, 2006; Tan *et al.*, 2007).

Les génomes de cultivars inexploitable par voie sexuée ont ainsi été intégrés au sein d'hybrides tétraploïdes par électrofusion de protoplastes (Grosser *et al.*, 1998; Ollitrault *et al.*, 2000 a,b). Des hybrides tétraploïdes ont ainsi été créés pour une vingtaine de combinaisons entre cultivars apomictiques. Un autre objectif visait la synthèse directe d'hybrides triploïdes par fusion de protoplastes haploïdes et diploïdes (Froelicher *et al.*, 2007). L'addition de l'ensemble des gènes des deux parents, sans tenir compte de leur hétérozygotie, trouve une application majeure pour la création de porte-greffes cumulant des caractères de résistance. L'obtention par hybridation symétrique d'alloplastes diploïdes et d'allotétraploïdes, possédant un même noyau hybride dans différents cytoplasmes, ouvrent la voie à l'étude des interactions

nucléocytoplasmiques. Dans ce sens, un hybride intergénérique a été créé entre *Poncirus trifoliata* et le mandarinier commun (*C. reticulata* Blanco) et a montré sa résistance à la tristeza et sa tolérance aux sols calcaires (Ollitrault *et al.*, 1998).

6-2-2- La transformation génétique

La transformation de différentes espèces d'agrumes a été réalisée par plusieurs méthodes, incluant la prise directe de l'ADN nu par les protoplastes (Kobayashi et Uchimiya, 1989), la transformation de cellules embryogéniques cultivées en suspension par l'intermédiaire d'*Agrobacterium* (Hidaka *et al.*, 1990; Dutt et Grosser, 2010), et le bombardement de particules (Yao *et al.*, 1996). Un premier rapport sur une production efficace et fiable de plantes transgéniques d'agrumes a été publié par Kaneyoshi *et al.* (1994). Depuis, la transformation génétique chez les agrumes a porté sur plusieurs variétés (Guo *et al.*, 2005; Koca *et al.*, 2009) et porte-greffes en vue d'améliorer leur performance (Dutt *et al.*, 2010; de Campos *et al.*, 2011) ou étudier la fonction de certains gènes (Peña *et al.*, 2001; Domínguez *et al.*, 2002; Fagoaga *et al.*, 2006; Tan *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010). La transformation par *Agrobacterium* en utilisant des explants juvéniles a réussi à produire des plantes transgéniques de Citrange Carrizo (Moore *et al.*, 1992); d'orange douce (Bond et Roose, 1998; Khan *et al.*, 2012), de bigaradier (Gutiérrez *et al.*, 1997); de pomélo (Luth et Moore, 1999), de lime Mexicaine (Domínguez *et al.*, 2000), et de Citrumelo Swingle (Molinari *et al.*, 2004). La procédure de transformation d'explants matures a été étendue à plusieurs génotypes d'intérêt, incluant plusieurs variétés d'oranger doux, bigaradier, limettier mexicain, mandarinier Cléopâtre, *C. macrophylla* et clémentine Clemenules (Peña *et al.*, 2008).

La co-culture de segments d'épicotyle avec *A. tumefaciens* a été appliquée par Gentile *et al.* (1998) et LaMalfa *et al.* (2000) pour régénérer des plantes transgéniques d'orange Tarocco et citrange Troyer avec respectivement les gènes (*rol*) d'*A. rhizogenes* et le gène (*gfp*) d'*Aequorea victoria* ; aussi par Koltunow *et al.* (2000) pour produire des limes transgéniques renfermant des gènes réduisant le nombre de pépins. Les recherches sur la transformation génétique servent principalement de base à des travaux de physiologie moléculaire concernant la synthèse de l'éthylène, la multiplication cellulaire, l'étude de certains gènes impliqués dans la qualité des fruits ou des mécanismes de résistance à des pathogènes (Goren et Goldschmidt, 2000). Cervera *et al.* (2000) ont réussi à transformer des plantes de Citrange Carrizo (considéré comme un excellent porte-greffe mais très sensible au sel), avec le gène *HAL2*

originellement isolé de la levure et impliqué dans les mécanismes de tolérance à la salinité (Murguía *et al.*, 1995, 1996). D'autres équipes visent également comme objectif la création de cultivars transgéniques pour la résistance à *Phytophthora citrophthora* (Fagoaga *et al.*, 2001), au virus de la tristeza (Domínguez *et al.*, 2002; Fagoaga *et al.*, 2006). Plusieurs études ont exploré la transgénèse de la résistance au virus de la tristeza sur pomélo (Moore *et al.*, 2000; Ananthakrishnan *et al.*, 2007; Febres *et al.*, 2008), sur lime mexicaine (Cervera *et al.*, 2010), sur orange douce (Orbović *et al.*, 2011).

La transformation de Citrange Carrizo avec le gène *Apetala1* impliqué dans l'initiation florale chez *Arabidopsis* a permis de rendre la phase juvénile très courte. La stabilité et l'hérédité de ce trait ont été démontrées (Peña *et al.*, 2001; Cervera *et al.*, 2009). La retransformation des plantes d'agrumes transgéniques *Apetala1* permettra aussi de tester l'effet de l'expression de certains transgènes sous des promoteurs spécifiques de fruit ou d'organe floral, ce qui ouvrira la voie à des stratégies biotechnologiques pour développer des variétés aspermes ou modifier les caractéristiques du fruit (couleur, goût, facilité d'épluchage) (Peña *et al.*, 2007). Une étude récente a montré que le gène *PtSvp*, un homologue du gène *Svp* d'*Arabidopsis* (*Short Vegetative Phase*) chez *Poncirus trifoliata* L. Raf., joue un rôle important dans l'initiation du bourgeon floral chez *Poncirus*. Il a été démontré que les gènes homologues à *Svp* chez les agrumes sont impliqués dans la régulation du temps de floraison et pourraient influencer l'identité de l'inflorescence du méristème dans certaines conditions ou bases génétiques (Li *et al.*, 2010). De telles méthodes pourraient permettre de modifier les stratégies d'amélioration des porte-greffes en permettant pratiquement de faire un cycle d'hybridation tous les ans (au moins tous les 2 ans) alors qu'aujourd'hui il faut 6 à 7 ans entre le moment où l'on fait une hybridation et celui où l'on pourra utiliser les hybrides comme parents pour faire un nouveau croisement. On pourrait ainsi, par exemple, envisager des stratégies de backcross pour introgresser dans un fond génétique du genre *Citrus* le gène d'immunité à la Tristeza du *Poncirus*.

Face à l'accroissement des contraintes biotiques et abiotiques auquel l'industrie des agrumes est confrontée, l'amélioration des agrumes constitue une composante majeure en vue de mettre en place une industrie agrumicole durable. Pour les porte-greffes, les hybrides inter-génériques diploïdes *Citrus* x *Poncirus* vont jouer un rôle important pour le contrôle du CTV, et les 1^{ers} des hybrides somatiques allotétraploïdes devraient être diffusés à l'industrie des agrumes au cours des prochaines années. Pour le long terme, Génomique et Biotechnologies vont fortement modifier l'efficacité de la sélection aussi bien pour l'amélioration

conventionnelle avec l'intégration de la sélection assistée par marqueurs que pour les stratégies de transformation génétique (Ollitrault et Navarro, 2012).

VII- Impact du stress salin et mécanismes de tolérance à la salinité

7-1-Les différentes composantes d'un stress salin et leurs implications sur la physiologie et le développement des plantes

La salinité affecte négativement tous les aspects du développement de la plante, depuis la germination, la croissance végétative, le développement reproductif etc. Indirectement, la salinité limite la productivité des plantes à travers ses effets défavorables sur le développement de micro-organismes bénéfiques et symbiotiques. Les conséquences d'un stress salin sont le résultat de trois types d'effets que le sel provoque chez les plantes :

- Un déficit hydrique: une forte concentration en sel dans le sol est tout d'abord perçue par la plante comme une forte diminution de la disponibilité en eau. La présence de solutés abaisse le potentiel osmotique, ce qui réduit le potentiel hydrique du sol autour des racines. Or le maintien d'un gradient de potentiel hydrique est nécessaire au mouvement de l'eau du sol vers les feuilles. Cela nécessite un ajustement osmotique adapté des cellules de la racine, afin que le potentiel hydrique cellulaire demeure inférieur à celui du milieu extracellulaire et à celui du sol. Ce phénomène assure d'une part, le maintien de l'absorption de l'eau du sol, et d'autre part, la rétention de l'eau intracellulaire et le maintien de la turgescence. Si l'ajustement osmotique n'est pas suffisant, l'eau va quitter les cellules ce qui provoque une perte de la turgescence (Munns, 2002; Kaviani, 2008; Ma *et al.*, 2008).
- Un stress ionique: en raison de la toxicité liée à l'accumulation d'ions spécifiques à des niveaux toxiques, particulièrement les ions sodium (Na^+), chlorure (Cl^-) ou sulfate (SO_4^{2-}) dans les tissus, en dépit d'un ajustement osmotique des cellules (Romero-Aranda *et al.*, 1998). L'accumulation de certains de ces éléments provoque un déséquilibre ionique aboutissant à des conséquences délétères pour la physiologie de la plante. L'exemple le plus étudié est celui du sodium. En condition normale, les concentrations de K^+ et Na^+ du cytosol sont de l'ordre de 100 mM et à moins de 10 mM respectivement. Le Na^+ entre en compétition avec K^+ dans de nombreux processus, tels que sa liaison à plusieurs enzymes où le K^+ joue le rôle de co-facteur réactionnel important ne pouvant être substitué par Na^+ . Une concentration élevée en

K^+ est aussi nécessaire pour relier l'ARNt aux ribosomes et permettre ainsi la synthèse des protéines (Zhu, 2002; Tester et Davenport, 2003).

- Un stress nutritionnel: des concentrations salines trop fortes de certains sels dans le milieu provoquent une altération de la nutrition minérale. Ce stress est en particulier vis-à-vis des transporteurs ioniques cellulaires, le sodium entre en compétition avec le potassium et le calcium, le chlorure avec le nitrate, le phosphate avec le sulfate (Levigneron *et al.*, 1995; Qi et Spalding, 2004). A titre d'exemple, il a été montré que Na^+ est en concurrence avec K^+ pour les systèmes communs de transport (Zhu, 2007), et le Ca^{2+} (Yokoi *et al.*, 2002).
- Un stress oxydatif: un résultat direct des changements cellulaires induits par le sel est l'accumulation des ROS, conduisant à la fin à un stress oxydatif secondaire dans les cellules des plantes (Haegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2003; Ledford et Niyogi, 2005; Miller *et al.*, 2008; Munns et Tester, 2008; Chaves *et al.*, 2009). L'accumulation de ROS peut également être accompagnée de l'accumulation en parallèle d'oxyde nitrique et autres RNS, qui sont responsables du pseudo-stress nitrosatif (Valderrama *et al.*, 2007). Cependant, il est à noter que des travaux récents relativisent l'importance du stress oxydatif par rapport aux composantes osmotique et ionique (Munns et Tester, 2008).

7-2- Effets du stress salin sur la croissance et la qualité des fruits

La réduction de la croissance et de la photosynthèse est le résultat combiné des différentes composantes d'un stress salin. La réponse d'une plante à un stress salin peut être subdivisée en deux phases majeures:

* Une réponse rapide (stress osmotique) se déclenchant immédiatement après que la concentration en sel autour des racines augmente au niveau seuil (40 mM NaCl pour la plupart des plantes), aboutissant à une réduction de la croissance sous l'effet de l'augmentation de la pression osmotique. Après ajustement osmotique, la croissance des organes peut reprendre, cependant, à des vitesses moins importantes que celles dans les conditions non stressantes.

* une réponse plus lente (stress ionique) due à une combinaison de l'accumulation à des concentrations toxiques de Na^+ dans les feuilles âgées et l'incapacité à tolérer les ions qui se sont accumulés, et ce jusqu'à la sénescence de ces feuilles.

La distinction entre l'effet osmotique et l'effet ionique spécifique nécessite des observations du taux de production de nouvelles feuilles et des dégâts causés sur les feuilles âgées. En effet, l'impact du stress osmotique est observé comme une inhibition rapide du taux d'émission des jeunes feuilles et une conductance stomatique réduite des feuilles matures. La réponse de la plante à la salinité, la plus forte dramatique mais aussi la plus facile à mesurer, étant une baisse de l'ouverture des stomates. Les réponses stomatiques sont sans doute induites par l'effet osmotique du sel à l'extérieur des racines.

Par ailleurs, la toxicité spécifique en ions est perçue comme une augmentation du taux de sénescence des feuilles âgées, due soit aux concentrations élevées de Na^+ dans les feuilles soit à une faible tolérance de Na^+ accumulé (Munns et Tester, 2008). L'importance relative de ces différents processus varie clairement avec les espèces mais aussi avec la durée d'exposition à la salinité, la concentration du sel et éventuellement les conditions environnementales locales, notamment les réserves en eau du sol et l'humidité de l'air, et par conséquent, le taux de transpiration et le potentiel hydrique foliaire.

Un des effets les plus marqués de la salinité est la réduction de la croissance des plantes soumises à ce stress. De nombreux travaux ont montré que la salinité provoque une réduction de la taille des plantes, de la matière fraîche, de la matière sèche ainsi que d'autres paramètres du développement végétatif tel que l'émission des talles chez les céréales. Chez les agrumes, une forte salinité réduit la taille des plantes, le diamètre des tiges, le nombre de feuilles par jeune plant et la biomasse racinaire (Singh *et al.*, 2004; Melgar *et al.*, 2008).

Chez les espèces sensibles, l'accumulation de sels dans les chloroplastes induit une réduction dans le contenu en chlorophylle, affecte le transport d'électrons photosynthétiques et inhibe donc l'activité PSII (Sudhir et Murthy, 2004). Les relations de cause à effet entre la photosynthèse et le taux de croissance sont difficiles à élucider. En effet, il est toujours difficile de savoir si un taux photosynthétique réduit est la cause ou le résultat d'une réduction de la croissance. Au début du stress salin, un taux réduit de photosynthèse est causé, d'une part, par une réduction de la croissance due au changement du taux d'extension des feuilles (Cramer et Bowman, 1991; Passioura et Munns, 2000; Fricke *et al.*, 2004), et d'autre part, par une accumulation des carbohydrates non assimilés et stockés (Munns *et al.*, 2000). Avec le temps, ceci pourrait générer des signaux retour pour réguler négativement la photosynthèse. (Munns et Tester, 2008).

La réduction de l'activité photosynthétique a été directement liée à la réduction du rendement chez le coton (Meloni *et al.*, 2003). Chez les agrumes, l'utilisation d'une eau d'irrigation chargée en sel réduit l'intensité de floraison, le nombre de fruits produits mais aussi leur qualité (Storey et Walker, 1999; García-Sánchez *et al.*, 2003; Jenks *et al.*, 2007). La salinité provoque une baisse de la qualité des fruits commercialisables, en raison de la diminution en pourcentage du jus de fruit, des solides solubles totaux et de l'acidité titrable (García-Sánchez *et al.*, 2003). Par ailleurs, la salinité réduit l'épaisseur de la peau mais n'a pas d'effet significatif sur les autres caractéristiques du fruit comme la taille, le rapport longueur/poids ainsi que la couleur (Maas, 1993).

7-3- Perception et transduction du signal salin

Le stress salin est perçu par les plantes comme un stress osmotique et ionique. L'excès de Na^+ et Cl^- induisant des changements conformationnels dans la structure des protéines et la dépolarisation membranaire- peut entraîner la perception de la toxicité ionique (Chinnusamy *et al.*, 2006). Les protéines de la membrane plasmique, les transporteurs des ions et/ou les enzymes sensibles- Na^+ ont été supposés les détecteurs des concentrations toxiques de Na^+ dans les sites intra et extracellulaires. *Sos1* (Salt Overly Sensitive1, antiport Na^+/H^+ de la membrane plasmique) est considéré être un des capteurs potentiels des ions Na^+ chez les plantes (Zhu, 2003). Un autre détecteur candidat potentiel, le co-transporter Na^+-K^+ a été décrit chez *Eucalyptus camaldulensis* (Liu *et al.*, 2001).

Par ailleurs, le stress osmotique imposé par la salinité entraîne une perte de la turgescence cellulaire ainsi qu'un changement du volume des cellules. Donc, les détecteurs potentiels du stress osmotique incluent des canaux activateurs d'extension qui sont associés à la membrane, des microtubules et microfilaments ainsi que des protéines kinases transmembranaires. L'un des détecteurs putatifs du stress osmotique chez *Arabidopsis* est le *Athkt1* (hybrid two-component histidine kinase) (Urao *et al.*, 1999).

La voie métabolique qui caractérise le mieux le signal spécifique à un stress salin serait probablement celle qui implique une augmentation du flux de Ca^{2+} dans le cytosol (Zhu, 2002). Dans cette voie, l'augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ induite par l'augmentation de Na^+ autour des racines, peut être perçue par une protéine: *CBL4* (*calcineurin B-like protein*), à l'origine identifiée comme *Sos3*. *Sos3* est un des éléments d'une voie de transduction aboutissant à

l'activation de l'antiport membranaire Na^+/H^+ *Sos1* impliqué dans l'exclusion du sodium (Qiu *et al.*, 2002; Quintero *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2002).

Les hormones jouent également un rôle clé dans la perception et la réponse au stress salin. En effet, il a été démontré que la réduction très rapide de la croissance en réponse à un stress salin, et bien qu'attribuée à la composante osmotique du stress, serait l'aboutissement de signaux hormonaux plutôt qu'hydriques (Munns, 2002). L'acide abscissique (ABA) est l'hormone principale des signaux cellulaires dans les racines et les pousses et joue un rôle très important dans la régulation de la croissance via la régulation des échanges gazeux et respiratoire au travers des stomates (Ulm *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2005). Dans des conditions de stress salin, l'ABA est impliqué dans la modification de l'ATPase de la membrane plasmique et du tonoplaste. L'action de l'ABA sur l'induction de la pompe H^+ -ATPase au niveau de la membrane plasmique se présente à un niveau d'expression génique (Janicka-Russak et Klobus, 2006).

7-4- Tolérance au sel chez les plantes

7-4-1- Diversité adaptative des plantes à un environnement salin

La plupart des plantes, qualifiées de glycophytes, sont sensibles au stress salin. Ceci regroupe les 250,000 espèces de plantes à fleurs et pratiquement toutes les cultures. Au contraire, les plantes halophytes se développent naturellement à des concentrations de NaCl supérieures à 400 mM et sont par conséquent tolérantes au stress salin (Malcolm *et al.*, 2003; Radyukina *et al.*, 2007; Zhu, 2007). Bien que taxonomiquement répandues, les plantes halophytes sont relativement rares et sont peu invasives (Flowers et Flowers, 2005). Les plus caractéristiques sont les salsolacées des genres *Arthrocnemum*, *Salicornia* (demeure vivante à 1020 mmolL⁻¹ d'NaCl), *Sueda*, *Salsola*, *Atriplex*, *Obione*. Les plantes halophytes ont généralement une grande capacité d'accumulation des ions toxiques au niveau de leurs parties aériennes (Parks *et al.*, 2002). Elles illustrent deux types d'adaptations: une augmentation induite par le sel de la taille des cellules due à un accroissement du volume des vacuoles (succulence), et l'excrétion de Na^+ et Cl^- par les glandes salines ou les vésicules (Flowers *et al.*, 1986). Une fois agrandies, les vacuoles seront munies d'une grande capacité d'internalisation des ions toxiques.

Les plantes sensibles au sel tolèrent un stress salin modéré, surtout grâce aux mécanismes qui réduisent le passage des ions toxiques par la racine. Parmi les plantes cultivées, certaines

cultures sont sensibles à la salinité du sol, par exemple le radis, le fraisier, le haricot vert, le céleri. Parmi les cultures en plain champ, le riz, le blé, le maïs et l'avoine sont moyennement tolérants tandis que l'orge est la plus tolérante. La tolérance des arbres fruitiers est variable selon l'espèce, certains arbres sont très tolérants comme le palmier dattier, d'autres assez tolérants comme l'olivier, le grenadier et la vigne. Les agrumes par contre comme le pommier, le prunier et le fraisier sont sensibles (Bouteyre, 1992).

Certains auteurs suggèrent que les réactions des plantes à la salinité diffèrent selon le stade de développement et que le comportement de certaines plantes comme le maïs, la fève et le haricot à des stades ultérieurs ne montre pas une réaction claire entre la résistance au stade germination et celle observée ultérieurement (Rajaskaran *et al.*, 2000).

Par ailleurs, la variabilité intraspécifique de tolérance au stress salin a été montrée pour plusieurs espèces, comme le pois chiche (Hajlaoui *et al.*, 2007), le maïs (Maiti *et al.*, 1996), l'orge (Hassani *et al.*, 2008), le riz (Yeo *et al.*, 1990) et la légumineuse *Medicago* (Lazrek, 2008). L'approche comparative entre plantes sensibles et plantes résistantes au sein d'une même espèce, a pour la plupart, été faite avec une comparaison physiologique. Cependant, la compréhension des différences de mécanismes physiologiques est loin d'aboutir à une explication génétique, vu que les liens entre les gènes et la physiologie restent inaccessibles chez les plantes. Il est nécessaire donc de découvrir les bases génétiques reliées aux différences phénotypiques liées à la tolérance au sel. Pour plusieurs plantes, la comparaison entre les différents génotypes peut aboutir à la localisation de QTL(s) lié(s) à la tolérance au sel et l'identification de gènes majeurs si une large différence existe entre écotypes. Des études faites sur *Arabidopsis* (Zhu, 2000, 2001) suggèrent que cette espèce peut contenir des versions de gènes importants qu'on pourrait trouver chez des espèces modèles d'halophytes, codant pour la résistance ou bien influençant la résistance au sel.

7-4-2- Mécanismes de tolérance au stress salin

L'adaptation des plantes aux conditions salines est tributaire de l'activation de cascades de mécanismes moléculaires impliqués dans la détection du stress, la transduction du signal et l'expression de gènes et de métabolites spécifiques liés au stress (Türkan et Demiral, 2009). Ces mécanismes, dont l'efficacité va être variable entre genre, espèce ou génotypes, visent à contrer les effets délétères du stress salin, à savoir les composantes osmotiques, ioniques, nutritionnelles et oxydatives.

Le tableau suivant résume quelques mécanismes ayant un rapport avec les trois composantes de la tolérance à la salinité, organisés par processus végétal impliqué.

Tableau 5. Mécanismes de tolérance à la salinité, organisés par des processus de la plante et leur intérêt pour les trois composantes de tolérance à la salinité.

(Munns et Tester, 2008)

Processus impliqué	Gènes candidats	Stress osmotique	Stress ionique	
		Tolérance osmotique	Exclusion de Na ⁺	Tolérance de tissu
Perception et signal dans les racines	<i>Sos3, Snrks</i>	Modification de signal longue distance	Contrôle du transport total d'ions aux pousses	Contrôle du chargement vacuolaire
Croissance des pousses	Aquaporines	Inhibition réduite de l'accroissement des cellules et développement du bourgeon latéral	Ne s'applique pas (les ions ne s'accumulent pas à des degrés toxiques dans les tissus en pleine croissance)	Retard dans la sénescence prématurée (source de carbone) des feuilles âgées
Photosynthèse	<i>Era1, Pp2c, AapK, Pks3</i>	Fermeture des stomates réduite	Prévention dans les chloroplastes de la toxicité en ions	Retard dans la toxicité en ions au sein des chloroplastes
Accumulation de Na ⁺ dans les pousses	<i>Hkt, Sos1</i>	Augmentation de l'ajustement osmotique	Réduction du transport longue distance de Na ⁺	Réduction de l'énergie épuisée sur l'exclusion de Na ⁺
Accumulation de Na ⁺ dans les vacuoles	<i>Nhx, Avp</i>	Augmentation de l'ajustement osmotique	Augmentation de la séquestration de Na ⁺ dans les vacuoles racinaires	Augmentation de la séquestration de Na ⁺ dans les vacuoles foliaires
Accumulation des solutés organiques	<i>P5cs, Ots, Mt1d, M6pr, S6pdh, Imt1</i>	Augmentation de l'ajustement osmotique	Modification des processus de transport pour réduire l'accumulation de Na ⁺	Accumulation de concentrations élevées de solutés compatibles dans le cytoplasme

- **Tolérance au stress osmotique ou homéostasie osmotique**

La survie des plantes dépend du maintien d'une turgescence positive, qui est indispensable à l'expansion de la croissance cellulaire et à l'ouverture des stomates. L'ajustement osmotique est l'une des composantes principales de la tolérance cellulaire au stress osmotique, aussi bien chez les plantes halophytes que glycophytes (Chinnusamy et Zhu, 2004; Chinnusamy *et al.*, 2005).

L'accumulation des ions sodium au niveau foliaire pourrait constituer une alternative pour l'ajustement osmotique. Cependant, une telle accumulation au niveau du cytoplasme a un effet toxique sur le métabolisme ce qui impliquerait également une inactivation de plusieurs processus physiologiques.

La compartimentation dans la vacuole permet de se protéger contre ces ions. Lorsque le sodium ou le chlore s'accumulent au niveau de la vacuole, un ajustement osmotique doit être également mis en place entre le cytoplasme et la vacuole. De ce fait, pour compenser l'abaissement du potentiel hydrique dans les vacuoles, la principale stratégie de régulation osmotique au niveau cytoplasmique est la biosynthèse par les cellules de composés osmoprotecteurs organiques appelés osmolytes compatibles (osmoticum). Il a été démontré que ces osmolytes protègent les plantes du stress non seulement par ajustement osmotique et maintien de la turgescence mais également par une activité de protection des dérivés réactifs de l'oxygène ROS et déstabilisation de la structure quaternaire des protéines (Yancey *et al.*, 1982; Bohnert et Jensen, 1996).

Ces solutés se divisent en 4 classes : les solutés contenant l'azote comme la proline et la glycine bêtaïne; les sucres comme le sucrose et le raffinose; les alcools polyhydriques à chaîne linéaire (polyols) comme le mannitol et le sorbitol; et les alcools polyhydriques cycliques (polyols cycliques) (Ashraf, 1994; Munns, 2005). Par ailleurs, les protéines *LEA* sont des protéines hydrophiles qui ont été découvertes dans les graines de coton matures (Dure *et al.*, 1981). Les protéines/gènes *LEA* ont une fonction universelle d'osmoprotection et seraient impliqués dans la machinerie cellulaire et dans le maintien des structures membranaires et protéiques, affirmant leur participation dans la réponse adaptative au stress (Xu *et al.*, 1996; Battaglia *et al.*, 2008). Ces protéines semblent fournir une capacité de fixation à l'eau ou aux sels. Une série d'expérimentations avec les levures recombinantes (*Saccharomyces cerevisiae*) ont montré que l'augmentation de la tolérance au stress était directement attribuable à l'accumulation des protéines *LEA* (Zhang *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2005; Mowla *et al.*, 2006). L'accumulation de grandes quantités de protéines *LEA* a également été associée à la tolérance à la déshydratation et au stress salin chez le blé et le riz (Ried et Walker-Simmons, 1993; Moons *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1996).

Les gènes impliqués dans la biosynthèse d'osmoprotectants sont régulés sous stress salin ou hydrique (Xiong *et al.*, 2001; Zhu, 2002). L'expression foliaire du gène *cLEA V* codant pour la protéine *cLEA V* chez les agrumes est induite par le stress oxydatif causé par trois types de stress, les stress salin et hydrique et les hautes températures (Naot *et al.*, 1995). Une augmentation de la tolérance au stress salin a été observée chez des plantes transgéniques conçues pour accumuler plus de mannitol (Shen *et al.*, 1997; Sheveleva *et al.*, 1997), de glycine bêtaïne (Kishitani *et al.*, 2000; Prasad *et al.*, 2000), de proline (Nanjo *et al.*, 1999; Hong *et al.*, 2000). De nombreuses études ont montré que les plantes transgéniques

surexprimant des gènes codant pour des protéines *LEA* et des "chaperons" moléculaires comme *Hav1*, un gène *LEA* de groupe 3, peuvent augmenter la résistance à la sécheresse, au sel, au froid et autres stress (Jyothisnakumari *et al.*, 2009). Par exemple, les plantes transgéniques comme le blé, l'avoine et le riz avec une surexpression du gène *Hav1* sont résistantes à la sécheresse et au sel et montrent une croissance améliorée (Xu *et al.*, 1996; Sivamani *et al.*, 2000; Maqbool *et al.*, 2002; Babu *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2007).

L'implication des gènes/protéines *LEA* dans la tolérance au stress salin et hydrique peut être justifiée par la corrélation qui existe entre l'expression de ces gènes/protéines ou leur accumulation et la tolérance au stress. En effet, la tolérance au stress chez diverses plantes transgéniques a nettement été améliorée suite à la surexpression des gènes codant pour les protéines *LEA*. L'accumulation de grandes quantités de protéines *LEA III* chez le blé a été associée à la tolérance à la déshydratation (Ried et Walker-Simmons, 1993). Celle des protéines *LEA II* et *LEA III* au stress salin chez le riz (Moons *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1996).

- **Tolérance au stress ionique ou homéostasie ionique**

Chez la plupart des plantes cultivées, les hautes concentrations en certains ions et plus particulièrement les ions sodium sont toxiques. Les concentrations de Na^+ dans le cytoplasme doivent demeurer faibles, éventuellement aussi faibles que des valeurs de 10-30 mM (Carden *et al.*, 2003). La tolérance des tissus à accumuler Na^+ ou Cl^- exige un compartimentage de Na^+ et Cl^- au niveau cellulaire et intracellulaire pour éviter les concentrations toxiques à l'intérieur du cytoplasme, surtout dans les cellules du mésophylle des feuilles. Plusieurs stratégies peuvent être mises en place par la plante afin de limiter l'effet toxique des ions. Plusieurs mécanismes peuvent alors contribuer à cet objectif par: i) la limitation de l'entrée du sodium au niveau du cortex racinaire, ii) l'exsudation du Na^+ des cellules racinaires vers le sol, iii) la limitation de sa translocation vers les feuilles, iv) la récupération de Na^+ à partir du flux transpirationnel du xylème pour le recirculer vers les racines, v) la compartimentation vacuolaire de Na^+ ou encore compartimentation dans les « vieux tissus », comme les feuilles les plus âgées (Zhu, 2002). Une combinaison du taux de sénescence des feuilles âgées avec des mesures de la concentration de Na^+ dans les feuilles fournirait une estimation de la tolérance tissulaire au sodium accumulé. A l'échelle cellulaire, les grandes quantités de Na^+ et Cl^- parvenant aux feuilles peuvent être toléré par les adaptations anatomiques (exemple: la succulence et les glandes salines chez les halophytes) et la répartition intracellulaire.

- *L'influx et l'efflux de Na^+ au niveau des racines*

La plupart des plantes excluent environ 98% du sel de la solution du sol, permettant à seulement 2% d'être transportés dans le xylème aux pousses (Munns, 2005). Cette exclusion est fondamentale. Cependant, les mécanismes développés pour empêcher la translocation du sodium absorbé vers les pousses sont tout aussi fondamentaux puisque la plupart du Na^+ qui est délivré aux pousses y reste. En effet, pour la majorité des plantes, le mouvement de Na^+ des pousses vers les racines dans le phloème ne peut probablement recirculer qu'une petite proportion de Na^+ de ce qui est délivré aux pousses. Il a été montré qu'il y a une forte corrélation entre l'exclusion du sel et la tolérance à la salinité chez plusieurs espèces (Munns et James, 2003; Tester et Davenport, 2003).

Le transport du sodium du sol vers la racine emprunte plusieurs voies, passive ou via des pompes (Fig. 10). Les transporteurs haute-affinité K^+ (*Hkt1*), les transporteurs faible-affinité cations (LCT1) et les canaux non sélectifs (NSCC-VI), constituent les système de transport le plus probable pour l'influx Na^+ (Amtmann et Sanders, 1999; Zhu, 2003; Zhang *et al.*, 2010). Chez *Eucalyptus camaldulensis* et quand les concentrations extracellulaires de Na^+ et K^+ sont égales, les transporteurs *Hkt* sont plus perméables à Na^+ qu'à K^+ (Liu *et al.*, 2001). Donc, sous stress salin, les homologues *Hkt* pourraient contribuer à l'influx Na^+ . Cependant, chez le riz, l'influx du sodium dans le xylème par la voie métabolique apoplastique semble être plus important (Garcia *et al.*, 1997). Davenport *et al.* (2007), ont récemment montré, en utilisant des traceurs radioactifs pour décortiquer les processus de transport contribuant à l'accumulation de Na^+ et K^+ , qu'*Athkt1* est impliqué dans la récupération de Na^+ à partir du xylème.

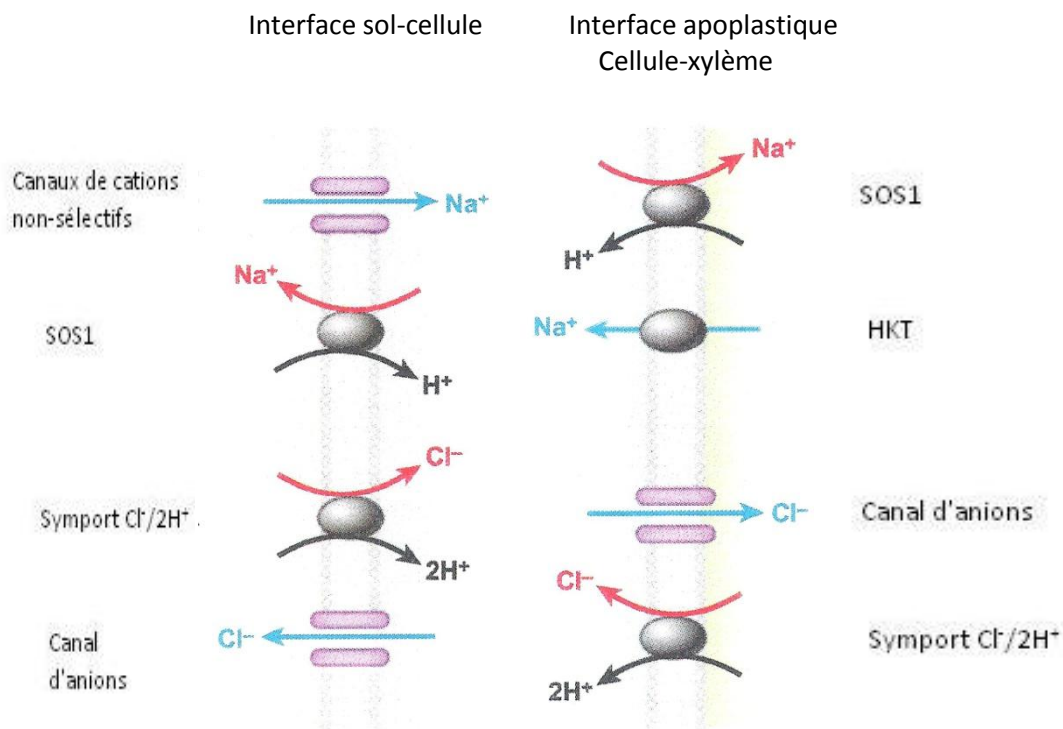


Figure 10. Mécanismes de transports passifs (en bleu) et actifs (en rouge) de Na^+ et Cl^- au niveau des deux interfaces sol-racine et cellule-vaisseau du xylème dans les racines. Ces transports impliquent des médiateurs comme les canaux d'ions et porteurs (uniports, antiports et symports couplés à H^+). *Sos1*, Salt Overly Sensitive mutant1, *Hkt*, transporteur haute-affinité K^+ .

(Munns et Tester, 2008)

Le sodium absorbé peut être ré-excrété hors du cytoplasme. L'efflux de sodium des cellules racinaires empêche l'accumulation de degré toxique de Na^+ dans le cytosol, et le transport de Na^+ vers les pousses. Une voie fondamentale de ce processus est la voie SOS dont les acteurs majeurs ont été identifiés par l'utilisation de mutants sensibles au sel. Des analyses de génétique moléculaire chez des mutants *SOS* d'*Arabidopsis* ont conduit à l'identification d'antiport de la membrane plasmique Na^+/H^+ , *Sos1*, qui sous stress salin, joue un rôle déterminant dans l'extrusion du sodium des cellules de l'épiderme racinaire et l'entrée de H^+ (Shi *et al.*, 2002). Il a été établi que les composantes de la voie métabolique SOS sont fonctionnelles non seulement chez les plantes glycophytiques comme *Arabidopsis* mais aussi chez les plantes halophytes telles que *Thellungiella halophila* (Vera-Estrella *et al.*, 2005), et *Populus euphratica* (Wu *et al.*, 2007) ainsi que chez les espèces monocot comme le riz et le blé (Mullan *et al.*, 2007).

Le degré de transcription de *Sos1* et son activité sous contrainte saline sont régulés par le complexe *Sos3-Sos2* kinase (Fig. 11) (Zhu, 2003). Les fortes concentrations de NaCl activent la voie de signalisation Ca^{2+} dépendante *SOS*. Le Ca^{2+} se lie à une protéine capteur *Sos3* dont il change la conformation (Ishitani *et al.*, 2000). *Sos3* se lie alors à la protéine *Sos2* et ce complexe phosphoryle l'antiport de la membrane plasmique Na^+/H^+ *Sos1* (Mahajan *et al.*, 2008; Oh *et al.*, 2010) (Fig. 11).

Chez des mutants *Sos3* et *Sos2*, l'activité d'échange Na^+/H^+ de membranes plasmiques isolées est significativement moindre que celle des plantes sauvages. Ces mutants se voient accumuler des degrés élevés de Na^+ , similaires à ceux accumulés par des mutants *Sos1* (Quintero *et al.*, 2002). En effet, une mutation de *AtSos1* chez *Arabidopsis thaliana*, provoque un phénotype sensible au sel suivi d'une mort des cellules racinaires sous stress salin (Oh *et al.*, 2010). Il en ressort que la voie métabolique de signalisation *Sos3-Sos2* régule positivement l'expression du gène *Sos1* induite par le stress salin et/ou la stabilité de transcription mais aussi l'activité du transporteur *Sos1* (Shi *et al.*, 2003). Par ce système de régulation de l'influx et de l'efflux, le flux de Na^+ à travers la membrane plasmique reste sous contrôle modulant ainsi la plante au stress salin (Qi et Spalding, 2004; Mahajan *et al.*, 2008).

• Recircularisation du sodium

Une fois le sodium absorbé, il est chargé au niveau de la sève brute. Des mécanismes peuvent alors se mettre en place pour que ce sodium ne soit pas délivré au niveau des organes photosynthétiques. La retranslocation du sodium par recharge du phloème compte parmi ces mécanismes de tolérance. Ceci a été observé chez quelques espèces comme le lupin (Munns *et al.*, 1988), le poivrier (Blom-Zandstra *et al.*, 1998), le maïs (Lohaus *et al.*, 2000), et chez la tomate sauvage (Pérez-Alfocea *et al.*, 2000).

Berthomieu *et al.* (2003), ont montré en étudiant les mutants *Hkt1* d'*Arabidopsis* que la recircularisation du sodium des pousses vers le phloème et par la suite les racines, est fondamentale pour la tolérance à la salinité. Sunarpi *et al.* (2005) confirment ces résultats par l'observation que ces mutants *hkt1* possèdent des niveaux bas de Na^+ au niveau du phloème et élevés au niveau du xylème. Plusieurs études sur des membres de la sous-famille de *Hkt1* chez le riz et le blé sont en accord avec une fonction de *AtHkt1* dans la récupération de Na^+ du xylème. En fait, malgré que *AtHkt1* catalyse l'influx de Na^+ dans les cellules, son effet à l'échelle de toute la plante est de réduire l'influx net de Na^+ au sein des pousses (Munns et Tester, 2008 ; Hauser et Horie, 2010).

- **Compartmentation vacuolaire du sodium**

Parmi les mécanismes d'adaptation les plus efficaces des plantes au sel, la compartimentation de Na^+ et Cl^- dans les vacuoles. Cette compartimentation est accomplie par le passage de Na^+ du cytosol vers la vacuole via un antiport Na^+/H^+ appelé *Nhx* (Apse *et al.*, 1999; Gaxiola *et al.*, 2001; Leidi *et al.*, 2010; Teakle et Tyerman, 2010). Au niveau de la membrane de la vacuole deux autres protéines la pompe H^+ -ATPase et la pompe H^+ -pyrophosphatase chargent la vacuole de protons H^+ afin de permettre l'activité de l'antiport Na^+/H^+ .

Le rôle central de ces pompes dans la compartimentation vacuolaire du sodium et la tolérance à la salinité sont confirmés par les essais de transformation génétique (Gaxiola *et al.*, 2001; Zhang et Blumwald, 2001; Zhang *et al.*, 2001; Apsse *et al.*, 2003; Xue *et al.*, 2004; He *et al.*, 2005; Brini *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007a). Globalement, tous les sur-expresssurs générés ont montré un meilleur pompage de Na^+ dans la vacuole et un maintien d'un contenu en eau relativement élevé dans les feuilles, augmentant la tolérance à la salinité et prouvant qu'une séquestration plus efficace de Na^+ pourrait améliorer la tolérance des tissus en réduisant les concentrations cytosoliques de Na^+ .

- **Coordination des voies**

Au niveau cellulaire, les mécanismes de tolérance peuvent fonctionner en synergie. L'homéostasie osmotique et ionique sont sous le contrôle d'hormones et de différentes cascades de type *MAPK* et plusieurs ponts de coordination existent entre les différentes voies (Fig. 11, 12) (Xiong *et al.*, 2002; Chinnusamy *et al.*, 2005).

Ainsi, il a été démontré que *Sos2* active les H^+ -ATPases vacuolaires assurant le maintien de la force protomotrice entre le cytosol et la vacuole, et générant un gradient H^+ qui stimule les antiports Na^+/H^+ type-*Nhx* induisant l'influx Na^+ dans la vacuole et contribue à sa détoxification (Chinnusamy *et al.*, 2005; Lv *et al.*, 2008). *Sos2* pourrait aussi limiter l'entrée de Na^+ dans le cytosol à travers les transporteurs Na^+ , *Hkt1* (Chinnusamy *et al.*, 2005) (Fig. 11). Par ailleurs, l'expression de *Nhx1* est induite par la salinité et l'ABA, via la protéine ABI1 chez *Arabidopsis* (Gaxiola *et al.*, 1999; Shi et Zhu, 2002), le riz (Fukuda *et al.*, 1999) et le coton (Wu *et al.*, 2004) (Fig. 11).

Il a également été rapporté que sous stress salin ou oxydatif, le gène *Sos1* communique avec le régulateur de réponse au stress oxydatif (*RCD1*). Plusieurs gènes liés à la tolérance au stress oxydatif ont été trouvés régulés par *Sos1* et *RCD1*. Ces résultats ont révélé pour la première fois, une fonction de l'antiport Na^+/H^+ de la membrane plasmique dans la tolérance

au stress oxydatif, et ont apporté un éclairage sur la communication entre les voies métaboliques de l'homéostasie ionique d'une part et la détoxification du stress oxydatif d'autre part, les deux impliqués dans la tolérance au stress salin chez les plantes (Chinnusamy *et al.*, 2004; Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006).

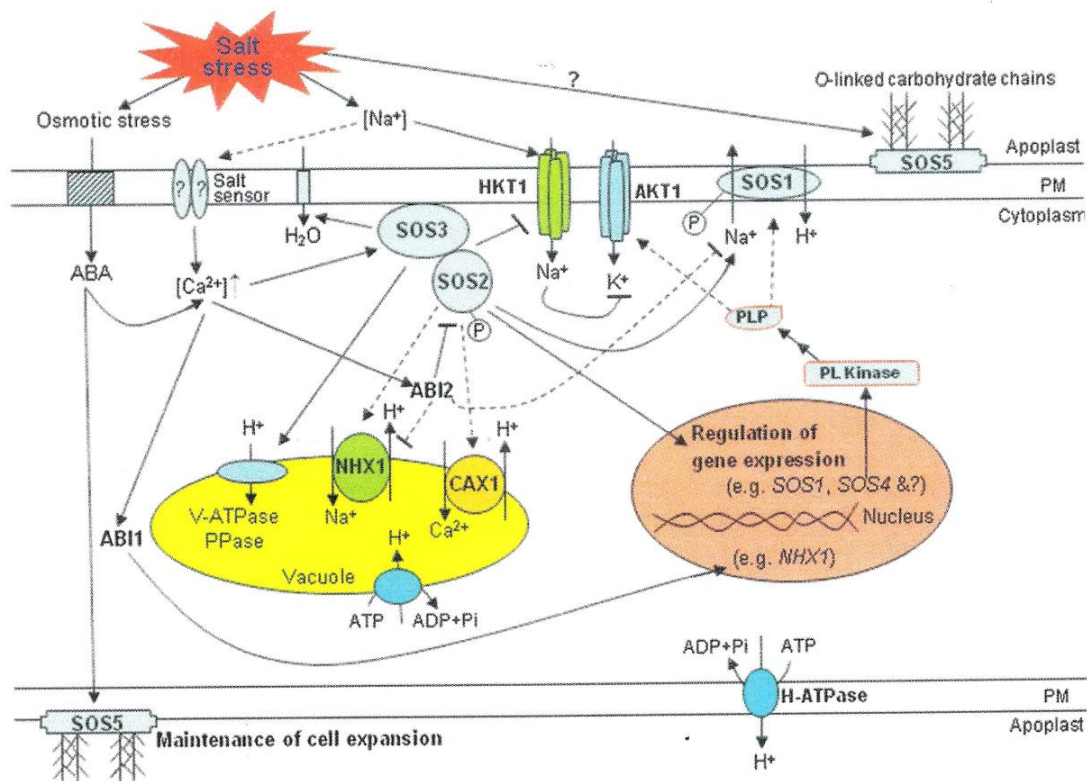


Figure 11. Régulation de l'homéostasie ionique par la voie de signalisation SOS pour l'adaptation au stress salin.

Le stress salin induit le signal Ca²⁺ qui active le complexe protéine kinase *Sos3/Sos2*, qui ensuite phosphoryle l'antiport de la membrane plasmique Na⁺/H⁺ *Sos1*, et régule l'expression de certains gènes également. *Sos2* active aussi l'antiport du tonoplaste Na⁺/H⁺ séquestrant Na⁺ dans la vacuole (*Nhx1*). *AB11* régule l'expression du gène *Nhx1*, alors que *AB12* interagit avec *Sos2* et régule négativement l'homéostasie ionique en inhibant l'activité kinase *Sos2* ou les activités des cibles de *Sos2*. *Cax1* (antiport H⁺/Ca²⁺) est un cible additionnel pour l'activité *Sos2* restituant l'homéostasie cytosolique Ca²⁺. Le complexe *Sos3/Sos2* régule négativement l'activité de *AtHkt1*. Le gène *Sos4* code pour une pyridoxale kinase (PL) qui est impliquée dans la biosynthèse de PL-5-phosphate (PLP), qui contribue à l'homéostasie Na⁺ et K⁺ en régulant les canaux et transporteurs ioniques. *Sos5* est impliqué dans le maintien de l'expansion cellulaire. Les flèches pointillées montrent les voies métaboliques *Sos3*-indépendant et *Sos2*-dépendant. PM: membrane plasmique.

(Türkan et Demiral, 2009)

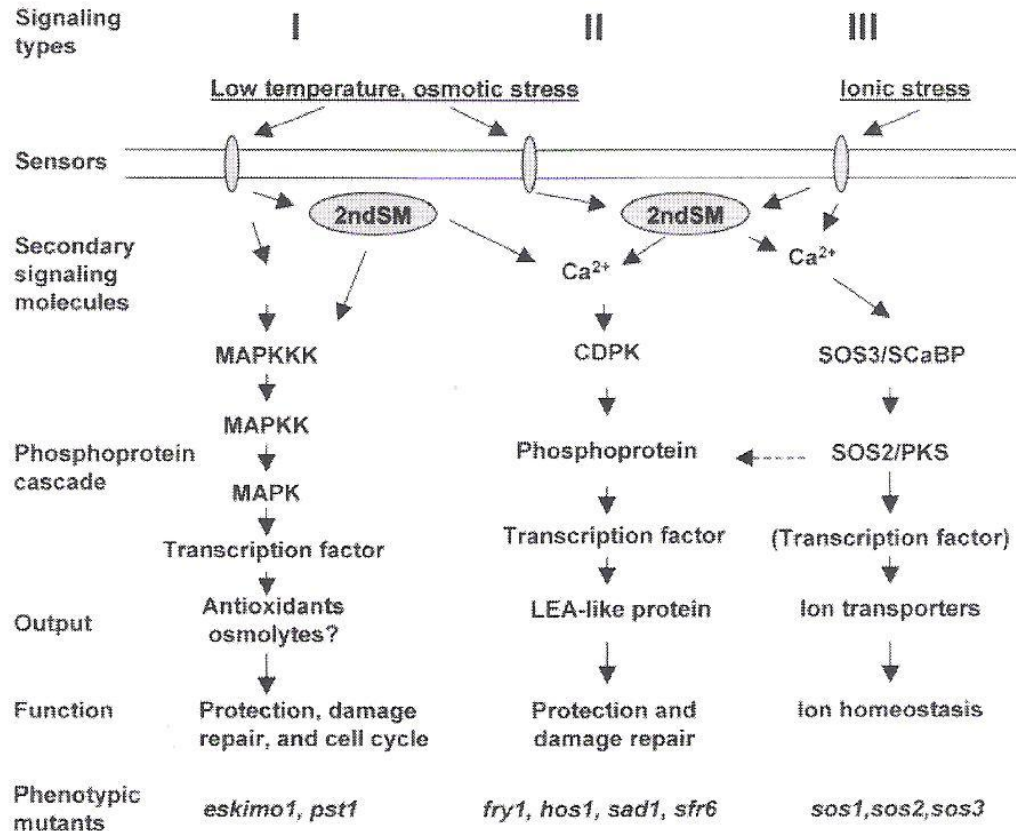


Figure 12. Les types majeurs de signalisation et leur implication pour les plantes durant les stress abiotiques : froid, sécheresse ou salinité. (Xiong *et al.*, 2002)

- **Tolérance par compartimentation tissulaire**

Lorsque la plante parvient à une accumulation préférentielle de Na⁺ à des concentrations toxiques dans les feuilles âgées, ces feuilles cessent alors de se développer et par conséquent ne peuvent plus diluer les sels qui les atteignent comme le font les jeunes feuilles, et finissent par mourir (Munns et Tester, 2008). Un taux de sénescence des feuilles âgées plus grand que le taux de production des nouvelles feuilles induit une réduction de la capacité photosynthétique de la plante ce qui, plutard, diminue le taux de croissance des jeunes feuilles. Une augmentation aussi bien de la tolérance osmotique que de la tolérance tissulaire accentue la capacité à maintenir la croissance en présence de Na⁺ dans les tissus foliaires. Seulement il demeure clair que, la tolérance osmotique est liée à la production de nouvelles feuilles, alors que la tolérance des tissus est plutôt liée à la survie des feuilles âgées. Une étude de réponse de la tomate au stress salin a montré un cloisonnement variable des ions Na⁺ entre feuilles jeunes et matures. La concentration de Na⁺ a été plus élevée chez les feuilles

matures à comparer avec les jeunes feuilles et ce jusqu'à un seuil de conductivité électrique $EC = 7.8 \text{ dS m}^{-1}$ (Maggio *et al.*, 2007).

- **L'accumulation de K^+ dans le cytoplasme**

Dans les plantes, K^+ est un macronutriment majeur et essentiel pour plusieurs processus cellulaires incluant l'activation enzymatique, la formation de la turgescence, la régulation du mouvement stomatique et la maintenance de l'homéostasie osmotique (Hauser et Horie, 2009). Cependant, dans les sols salins, le sodium entre en compétition avec le potassium pour l'assimilation à travers la membrane plasmique des cellules végétales. Ceci peut entraîner un taux élevé de Na^+/K^+ qui réduit la croissance des plantes et devient éventuellement toxique (Schachtman et Liu, 1999). Plusieurs types de transporteurs jouant le rôle de médiateurs ont été identifiés dans l'assimilation de K^+ dans la plante (Leidi *et al.*, 2010). Il a été montré que sous contrainte saline, chez *Arabidopsis* (Uozumi *et al.*, 2000), *Eucalyptus* (Liu *et al.*, 2001), et blé, les transporteurs haute-affinité K^+ (Hkt) agissent comme transporteurs faible-affinité Na^+ (Gorham *et al.*, 1997). La compétition entre Na^+ et K^+ se fait au niveau des transporteurs haute-affinité K^+ (Hkt1), des transporteurs faible-affinité cations (LCT1) et des canaux à cations non sélectifs (NSCC-VI), où une réponse au stress est suivie d'une élévation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique (Lan *et al.*, 2010; Leidi *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). La surexpression de *AtHal3a* (un régulateur du transport de K^+) chez la levure et *Arabidopsis* a conféré une augmentation de la tolérance à la salinité (Espinosa-Ruiz *et al.*, 1999), de même pour des plantes transgéniques de melon surexprimant le gène *Hall* (Bordás *et al.*, 1997). Par ailleurs, des plantes transgéniques de tomates surexprimant le gène *Hall* ont montré une meilleure tolérance au sel que le contrôle (Rus *et al.*, 2001), suggérant que l'accumulation de K^+ est un trait important pour la tolérance à la salinité.

Les comparaisons des mécanismes de tolérance à la salinité chez différentes espèces seront fondamentales pour comprendre les points réglementaires déterminant les mécanismes moléculaires susceptibles de fournir la tolérance à la salinité. Durant la gestion du stress salin, de nouvelles approches sur la compréhension des éléments importants de la régulation métabolique sont en cours de développement, moyennant l'évolution rapide des technologies de la métabolomique (Shulaev *et al.*, 2008).

7-5- Accumulation et distribution des ions chlorure et sodium chez les agrumes en condition de stress salin

Les agrumes sont considérés être sensibles au sel (Arbona *et al.*, 2003). Cette sensibilité dépend de plusieurs paramètres comme l'âge de la plante (Sykes, 1985), la combinaison porte-greffe/scion (Anjum *et al.*, 2001; Almansa *et al.*, 2002; García-Sánchez *et al.*, 2002; Rochdi *et al.*, 2003; García-Sánchez *et al.*, 2006), le climat et type de sol (Gimeno *et al.*, 2010).

La tolérance à la salinité chez les agrumes est fortement liée à l'accumulation des chlorures dans les feuilles (Storey et Walker, 1999; Brumós *et al.*, 2009; Hussain *et al.*, 2012).

Na^+ est efficacement retenu dans les racines et les tiges de plantes ligneuses, de façon que seule une faible partie atteint les feuilles. Par contre, Cl^- continue à passer aux feuilles et devient alors le composé le plus significativement toxique de la solution saline (Munns et Tester, 2008; Teakle et Tyerman, 2010). Ceci ne veut en aucun cas dire que Cl^- est métaboliquement plus toxique que Na^+ , mais plutôt que les espèces sensibles réussissent mieux à exclure Na^+ que Cl^- des feuilles. Des études génétiques ont montré que contrairement au blé par exemple (Gorham *et al.*, 1990), la tolérance à la salinité est corrélée négativement avec l'accumulation de Cl^- dans les feuilles et non celle de Na^+ (Romero-Aranda *et al.*, 1998; Storey et Walker, 1999; Moya *et al.*, 2003). Ceci est également le cas d'autres espèces comme la vigne (Antcliff *et al.*, 1983) ou l'avocat (Bar *et al.*, 1997).

La concentration cytosolique de Cl^- est probablement entre 10 et 20 mM, mais peut être plus élevée dans les conditions salines où le chlore devient toxique pour les espèces sensibles. En fait, le chlorure est un nutriment essentiel et un des anions inorganiques les plus abondants dans les tissus des plantes. Il est impliqué dans la régulation de fonctions cellulaires importantes comme l'activité enzymatique, les potentiels membranaires, les gradients de pH et la réactivité électrique (Xu *et al.*, 1999; White et Broadley, 2001). De plus, Cl^- est un soluté osmotique majeur dans la vacuole impliqué aussi bien dans les processus de turgescence et d'osmorégulation (Marschner, 1995). Le transport de Cl^- résulte de la combinaison des activités de l'influx (transport actif) via des antiports Cl^-/H^+ (Felle, 1994) (Figure 10), et celles de l'efflux (transport passif) via des canaux d'anions (Skerrett et Tyerman, 1994; Roberts, 2006).

Selon Hechenberger *et al.* (1996), les canaux Cl^- type voltage-dépendant (CLC) se trouvent chez tous les procaryotes et les eucaryotes, ils sont responsables du transport passif de Cl^-

sous contrôle du gradient électrochimique. Plusieurs gènes codent pour ces canaux de type *CLC* chez le tabac (Lurin *et al.*, 1996), *Arabidopsis* (Hechenberger *et al.*, 1996). Par ailleurs, une preuve incontestable a été fournie sur l'occurrence des co-transporteurs cation-Cl⁻ (CCC) au sein du règne végétal et leur rôle significatif dans les processus de développement des plantes et l'homéostasie de Cl⁻ (Colmenero-Flores *et al.*, 2007). Une étude récente a évalué le potentiel des transporteurs d'anions *Ccc*, *Slah1* (Negi *et al.*, 2008) et *ICln1* (Krapivinsky *et al.*, 1994; Ritter *et al.*, 2003) dans l'homéostasie de Cl⁻ chez des porte-greffes d'agrumes *Cl⁻-exculder* et *Cl⁻-inculder* (Brumós *et al.*, 2010). Lors de cette étude, le gène *ICln*, précédemment non caractérisé chez les plantes, a présenté une forte répression suite à une application de 4.5 mM Cl⁻, ce qui était spécifique aux porte-greffes tolérants de type *Cl⁻-exculder*.

En conditions salines, les canaux Cl⁻ sont régulés par l'ABA, limitant le transfert de Cl⁻ vers les pousses. Ceci peut être obtenu après un chargement réduit de Cl⁻ via les canaux d'anions, ou suite à une récupération active accrue de Cl⁻ à partir du flux du xylème pour atteindre soit les pétioles, les tiges ligneuses et les racines. Par ailleurs, il a été proposé que la base physiologique pour la tolérance à la salinité chez les agrumes est essentiellement liée à la capacité d'exclusion de Cl⁻, ou à la capacité d'une plante à limiter l'assimilation de Cl⁻ et son transport des racines aux feuilles, un mécanisme dont l'efficacité est particulièrement tributaire de la performance du porte-greffe (Moya *et al.*, 1999; Iglesias *et al.*, 2007; Brumós *et al.*, 2010). Vis à vis de la salinité, Zekri et Parsons (1992) ont classé une série de porte-greffes du plus tolérant au plus sensible: Mandarinier Cléopâtre (*Citrus reshni* Hort.Ex Tan.), Ellendale (*C. reticulata* Blanco X *Citrus sinensis* (L.) Osb.) X trifolié (*Poncirus trifoliata* [L.] Raf.), lime Rangpur (*Citrus limonia* Osbeck), Macrophylla (*C. macrophylla* Wester, CM), bigaradier (*C. aurantium* [L.]), orange douce (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck)= Citrumello Swingle (*C. paradisi* Macf X *Poncirus trifoliata* [L.] Raf.), Volkameriana (*C. volkameriana* Ten) = rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush), citrange Carrizo (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck X *Poncirus trifoliata* [L.] Raf.), citrange Troyer (*Poncirus trifoliata* [L.] Raf. X *Citrus sinensis* [L.] Osbeck) et enfin poncirus trifolié (*Poncirus trifoliata* [L.] Raf.).

La forte tolérance à la salinité du mandarinier Cléopâtre (*Citrus reshni* Hort. Ex Tan.) a été prouvée (Zekri et Parsons, 1992; Cámara Zapata *et al.*, 2004), puisque seul ce porte-greffe a présenté la plus faible réduction de la croissance induite par l'effet de NaCl (50mM NaCl). Le mandarinier Cléopâtre (*Citrus reshni* Hort. Ex Tan.) et la lime Rangpur (*Citrus limonia* Osbeck) ont été classés comme porte-greffes "*excluder*" de chlorure et ayant une décharge

réduite de Cl^- dans le xylème expliquant leur tolérance. Par contre, citrange Carrizo (*Citrus sinensis* (L.) Osb. X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) et rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush) sont définis comme étant "includer" de Cl^- en raison de leur capacité limitée à exclure l'anion, ce qui est corrélé avec leur sensibilité accrue au sel (Gómez-Cadenas *et al.*, 2003; Al-Yassin, 2004; Levy et Syvertsen, 2004). Les porte-greffes tolérants à la salinité semblent être munis de mécanismes racinaires plus efficaces pour l'exclusion de Cl^- que ceux des porte-greffes sensibles (Moya *et al.*, 2003). Dans ce cas, même si ces mécanismes demeurent peu connus, il est évident qu'ils dépendent des transporteurs de la membrane plasmique qui devraient réguler l'assimilation de Cl^- par l'épiderme des racines et/ou son transport sur longue distance dans le cylindre vasculaire (Colmenero-Flores *et al.*, 2007; Brumós *et al.*, 2009).

Les variétés (scions) jouent aussi un rôle pour les dégâts dus au sel, et les variétés les plus tolérantes comme la clémentine sont, généralement, préférées aux oranges douces (Iglesias *et al.*, 2004). L'accumulation de Na^+ et Cl^- dans les feuilles peut être influencé par le porte-greffe, le scion ou les deux selon la combinaison porte-greffe/scion. En terme d'impact, il a été prouvé que l'accumulation de Cl^- dans les feuilles peut être étroitement corrélé aux dégâts foliaires (% défoliation) de l'orange Navel et de la mandarine Clémentine (Bañuls et Primo-Millo, 1995), au Cl^- du jus pour les variétés de pomélo Marsh sans pépins et l'orange Washington Navel (Levy et Shalhevet, 1990), ou aussi au rendement qu'une combinaison peut donner (Levy *et al.*, 1992). Une étude récente s'est proposée d'analyser la réponse physiologique au stress salin de 12 génotypes d'agrumes incluant les espèces d'agrumes majeures ainsi que les trois genres de la famille des *Rutaceae*. Les résultats ont clairement démontré que les génotypes les plus sensibles au sel ont accumulé de fortes concentrations de Na^+ et Cl^- et ont maintenu une croissance et un taux photosynthétique durables. Par contre, les génotypes tolérants au sel ont accumulé moins de Na^+ et Cl^- et ont diminué leur croissance et l'échange de gaz. A titre d'exemple, le cédratier Poncire commun et le kumquat Marumi étaient les espèces les plus sensibles, alors que les mandariniers, les pamplemoussiers et le bigaradier Australien constituaient les espèces les plus tolérantes. Le faible contenu en Cl^- dans les feuilles pourrait être considéré comme un indicateur de tolérance au stress salin chez les génotypes d'agrumes. L'exploitation d'un tel indicateur permettrait d'améliorer l'évaluation génétique des ressources actuelles et l'identification de nouvelles sources de tolérance pour l'amélioration des agrumes (Hussain *et al.*, 2012).

7-6- L'amélioration génétique des agrumes pour la tolérance à la salinité

La tolérance à la salinité est généralement mesurée comme la production de biomasse relative ou le rendement relatif sous des conditions salines et non-salines (Munns *et al.*, 2002).

Par contre, l'amélioration génétique peut viser plutôt le développement de variétés ayant les meilleurs rendements sous stress salin.

L'amélioration génétique pour la tolérance à la salinité est difficile dans la mesure où la tolérance à la salinité est un caractère multigénique (Lindsay *et al.*, 2004). Concernant les agrumes, le problème devient encore plus complexe étant donné l'interaction porte-greffe/scion. De même les porte-greffes des agrumes ont une influence considérable sur la croissance et la qualité de des fruits (sucres, acidité, contenu en caroténoïdes, pH, goût, couleur, texture du fruit) sous stress salin (Bassal, 2009; Navarro *et al.*, 2010). Les programmes d'amélioration génétique pour la tolérance à la salinité utilisent plusieurs méthodologies conventionnelles ou non conventionnelles.

7-6-1- Amélioration conventionnelle

La sélection des porte-greffes d'agrumes pour la tolérance à la salinité a été faite principalement sur la base de la capacité à exclure Cl^- et Na^+ qui est considérée comme un caractère héréditaire. Les populations issues d'hybridation sexuée ségrégent selon leur capacité à réduire l'accumulation de ces éléments dans les tissus. Seulement, il apparaît que l'amélioration génétique par les méthodes conventionnelles sexuées est difficile et est tributaire de plusieurs facteurs. La biologie reproductive ainsi que l'hétérozygotie des géniteurs ont induit une ségrégation importante des caractères dans la progéniture et une faible probabilité d'obtenir des hybrides recombinants, cumulant tous les gènes et traits souhaitables des deux parents (Ollitrault *et al.*, 2000a). A ceci s'ajoute la longévité de la période juvénile chez les agrumes qui prolongent les programmes d'amélioration des porte-greffes et les rendent coûteux.

Récemment, un nouveau génotype Forner-Alcaide #5 (Forner *et al.*, 2003) sélectionné pour combiner aussi bien la tolérance au CTV fournie par *P. trifoliata* que la capacité d'exclusion de Cl^- du mandarinier Cléopâtre (CM), a été testé. Ce génotype a semblé être tolérant à la salinité (López-Climent *et al.*, 2008; Forner-Giner *et al.*, 2009), aux sols calcaires (Forner *et*

al., 2003; Gonzalez-Mas *et al.*, 2009) et plus résistant au stress hydrique que ses deux parents (CM et PT) (Rodríguez-Gamir *et al.*, 2010).

7-6-2- La mutagenèse *in vitro*

La mutagenèse *in vitro* est une autre approche qui a été utilisée pour générer des lignées de cals cellulaires résistants à la salinité (Piqueras *et al.*, 1996). Cependant, le manque de popularité de cette méthode est dû au faible lien qui existe entre la tolérance des lignées de cellules *in vitro* et celle attendue sur les plantules régénérées. En effet, il faut savoir que lorsqu'on considère la plante entière, la tolérance à la salinité dépend de l'association des mécanismes anatomiques et physiologiques qui sont établis au niveau de toute la plante et pas seulement au niveau cellulaire (Noble et Rogers, 1992). La mutagenèse induite par des agents chimiques ou des rayonnements radioactifs, a néanmoins, permis l'obtention de mutants, respectivement de citrange Troyer et d'orange, résistants au sel (Zhanao *et al.*, 1993; García-Agustín et Primo-Millo, 1995).

7-6-3- Utilisation de la ploïdie

Alors que les triploïdes présentent des qualités en tant que variétés telles que l'aspermie, les tétraploïdes peuvent avoir des qualités encore plus recherchées en tant que porte-greffe comme la résistance aux contraintes biotiques et abiotiques (Syvertsen *et al.*, 2000; Saleh *et al.*, 2008). Adams *et al.* (2003) ont indiqué que la vigueur de croissance ainsi que la biomasse sont potentiellement avantageuses chez les allopolyploïdes à cause des changements dans l'expression des gènes résultant d'une augmentation de l'hétérozygotie. Ceci est rendu possible grâce au phénomène de sub-fonctionnalisation qui s'opère par des modifications de régulation épi-génétique chez les allopolyploïdes. En effet, l'accroissement de l'hétérozygotie par le nombre de copies chromosomique permet une spécialisation de plusieurs copies de gènes dans des fonctions complémentaires conduisant à un nouveau caractère, favorisant l'adaptation au milieu. Chez ces allopolyploïdes, il a été démontré que les changements indiqués dans l'expression du génome sont plus fortement affectés par l'hybridation génomique que par les changements de la ploïdie (Auger *et al.*, 2005). De ce fait, les interactions parmi les génomes devraient jouer un rôle important dans le développement de nouveaux phénotypes chez les allopolyploïdes (Chen, 2007).

Aujourd'hui chez les agrumes, on assiste à un intérêt renouvelé pour les lignées tétraploïdes utilisées comme parents aussi bien dans les programmes d'amélioration génétique des

triploïdes aspermes (Ollitrault *et al.*, 2008) que pour l'amélioration génétique des porte-greffes (Saleh *et al.*, 2008). Plusieurs études ont eu comme objectif de développer le pool génique tétraploïde par hybridation somatique (Grosser *et al.*, 2000, 2010) ou par sélection de plants tétraploïdes (Aleza *et al.*, 2011).

Le comportement des porte-greffes d'agrumes tétraploïdes sous condition de stress salin n'a pour l'instant été que peu étudié et seuls quelques exemples sont cités en bibliographie. En se basant sur la croissance des plants et l'accumulation du chlorure dans les feuilles sous stress salin, des plants autotétraploïdes d'orange trifolié, de Citrange Carrizo et de mandarine Cléopâtre ont montré une meilleure tolérance au stress que leurs parents diploïdes respectifs (Saleh *et al.*, 2008). La supériorité des tétraploïdes par rapport aux diploïdes n'est cependant pas systématique. Mouhaya (2008) a montré que la tolérance au stress salin modéré chez les porte-greffes tétraploïdes (allo et auto) est dépendante de l'application d'un déficit hydrique. Les tétraploïdes ne sont plus tolérants que les diploïdes que lorsque le stress salin est associé à un déficit hydrique. Par ailleurs, et dans des conditions de stress sévère, induit par une augmentation progressive de la salinité (50-400 mM sur 8 semaines) et en présence d'une irrigation journalière, les plants tétraploïdes sont certainement plus sensibles au stress salin que les 2X (Mouhaya *et al.*, 2010).

Par ailleurs, il a été montré que des porte-greffes tétraploïdes de lime Rangpur greffés avec la variété d'orange Valencia, étaient plus tolérants au déficit hydrique que leurs porte-greffes respectifs lime Rangpur diploïdes greffés avec la même variété. Des analyses par puce à ADN et de la RT-PCR quantitative ont permis de déduire que cette tolérance est liée à la sur-expression, au niveau racinaire, de certains gènes impliqués dans l'adaptation aux contraintes environnementales (Allario, Communication personnelle).

La polyploïdisation par hybridation somatique constitue aussi un nouvel outil très intéressant pour l'analyse des règles de l'hérédité de traits phénotypiques chez les agrumes. Récemment, une étude du CIRAD a permis la création d'un porte-greffe intergénérique allotétraploïde somatique FLHORAG1 (*Poncirus trifoliata* cv.pomeroy X *C. deliciosa* Ten. Cv. Willow leaf). Cet hybride a hérité l'immunité à la tristeza du *Poncirus trifoliata* et présente également un comportement excellent sur sol calcaire à l'image du mandarinier commun. Aussi, il a montré une forte tolérance au stress salin (Mademba-Sy, 2004; Saleh *et al.*, 2008; Mouhaya *et al.*, 2010).

7-6-4- Ingénierie génétique

La tolérance à la salinité est un trait complexe chez les plantes, mais les approches moléculaires et génétiques ont démarré la caractérisation de divers événements biochimiques aboutissant à une réponse au stress salin (Winicov, 1998). En reconnaissant que l'augmentation de l'expression d'un nombre de gènes fonctionnellement liés pourrait être nécessaire pour améliorer la tolérance à la salinité, l'ingénierie moléculaire s'est élargie pour inclure des programmes de transfert de gènes multiples (Bohnert et Jensen, 1996). Dans un but de fournir des moyens utiles à l'amélioration des agrumes, plusieurs études ont contribué à la découverte de gènes d'intérêts agronomiques majeurs, comme pour la tolérance à la salinité, et au développement de nouveaux marqueurs et méthodes permettant d'identifier rapidement des génotypes améliorés (Terol *et al.*, 2007; Ollitrault *et al.*, 2010).

Comme pour les autres traits agronomiques, l'amélioration génétique pour la tolérance à la salinité nécessite (a) une justification économique, (b) une variation génotypique, (c) une méthode de sélection rapide et fiable et (d) une compréhension du contrôle génétique (Genc *et al.*, 2010). Les deux premiers critères étant déjà satisfaits, mais les 3^{ème} et 4^{ème} critères demandent un travail plus poussé. Les variations spatio-temporelles ont fait qu'il est relativement difficile d'évaluer la tolérance à la salinité au champ, même si plusieurs méthodes de criblage ont été développées (Munns et James, 2003). Ces méthodes coutent cher, sont chronophages et nécessitent une validation au champ (Lindsay *et al.*, 2004; Chinnusamy *et al.*, 2006). De plus, le trait de tolérance à la salinité demeure complexe tant physiologiquement que génétiquement (Colmer *et al.*, 2005; Munns et Tester, 2008). Pour contourner ces problèmes, il a été suggéré que l'amélioration génétique pour la tolérance à la salinité devrait se concentrer sur la sélection basée sur des caractères quantitatifs d'adaptation (Rajendran *et al.*, 2009) plutôt que sur la sélection phénotypique pour le rendement et ses composantes. Ce qui a conduit à l'identification de caractères physiologiques de la tolérance à la salinité qui pourraient rehausser le rythme des programmes d'amélioration génétique. Ces caractères physiologiques, appelés aussi QTLs, sont souvent contrôlés par plusieurs gènes et montrent une variation continue dans les populations qui ségrégent. En mettant en œuvre cette approche basée sur les traits, l'identification de ces QTLs, leur cartographie suivie par la sélection assistée par marqueurs et le clonage de gènes candidats, se voient d'un grand potentiel pour accélérer les processus d'amélioration génétique (Genc *et al.*, 2010). L'application des marqueurs moléculaires pour identifier les QTLs relatifs aux traits physiologiques ont beaucoup aidé à identifier les QTLs liés à la tolérance au stress salin chez

le riz (Koyama *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2007), la tomate (Foolad et Chen, 1999; Foolad, 2004), l'orge (Rivandi, 2009; Shavrukov *et al.*, 2010; Xue *et al.*, 2010), le blé tendre (Quarrie *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2007; Edwards *et al.*, 2008; Ogbonnaya *et al.*, 2008), le blé dur (Lindsay *et al.*, 2004) et *Arabidopsis* (Quesada *et al.*, 2002).

Il est intéressant de noter que la plupart des études de ces QTLs étaient de courte durée (1-2 semaines) et portaient soit sur les traits morphologiques (croissance des pousses) soit sur les traits physiologiques (chlorophylle, concentrations de Na⁺ et/ou K⁺ dans les feuilles), mais très peu d'études traitaient les deux aspects ensemble (Ma *et al.*, 2007; Rajendran *et al.*, 2009; Xue *et al.*, 2009). Vu qu'il y a encore très peu d'études initiées sur les agrumes concernant la qualité et la salinité, on s'est proposé de parler d'autres espèces susceptibles de nous apporter plus d'infos pour notre contexte.

Des études sur l'orge ont rapporté que la plupart des QTLs varient avec les traitements, tandis que l'étude sur le blé a présenté des rapports de valeurs sous condition saline et non saline; d'où, le doute persiste pour comprendre si les QTLs diffèrent avec les degrés du stress salin ou s'ils sont exprimés constitutivement (Genc *et al.*, 2010).

Les analyses de QTLs ont clairement établi que i) la tolérance à la salinité est gouvernée par plusieurs gènes; ii) la contribution de QTLs significatifs et individuels peut varier de 5% à 50%, selon la complexité du trait; iii) la réceptivité au stress des QTLs indique le rôle déterminant de la régulation des gènes durant le stress; et iv) les QTLs pour la tolérance à différents stades phénologiques déterminent les changements dans les mécanismes de tolérance au sel durant le développement de la plante (Chinnusamy *et al.*, 2006). L'identification de gène(s) contribuant aux QTLs majeurs et le transfert (amélioration génétique/ ingénierie génétique) de gène régulateur unique qui contrôle l'expression de plusieurs gènes cibles améliorera de manière significative la vitesse de développement des cultures tolérantes au sel. En effet, les approches transgéniques ont prouvé les possibilités de transfert de gène à travers les organismes et l'ingénierie de tolérance au sel par la manipulation d'un seul ou plusieurs gènes. L'ingénierie génétique de transporteurs ioniques a significativement montré son amélioration de la tolérance à la salinité (Zhang et Blumwald, 2001; Shi *et al.*, 2003). La manipulation transgénique des molécules signaux et des facteurs de transcription sera très avantageuse, du fait que l'ingénierie d'un seul gène peut changer l'expression de plusieurs gènes cibles impliqués dans la réponse au stress et fournissant une

tolérance multiple au stress abiotique (Kasuga *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 2004; Teige *et al.*, 2004).

Certains avis divergent quant à l'existence d'une corrélation entre la faible concentration de Na^+ dans les feuilles et la tolérance à la salinité (Husain *et al.*, 2003; Munns et James, 2003; Huang *et al.*, 2006; Bagci *et al.*, 2007; Genc *et al.*, 2007). Pour les études menées sur le riz, l'orge et le blé citées précédemment, un nombre de QTLs a été identifié pour l'exclusion de Na^+ chez ces espèces. Seulement, leurs effets sur le rendement ou la biomasse aussi bien sur le plan phénotypique que sur le plan génétique n'ont pas été déterminés. Par ailleurs, sachant qu'une plus forte concentration de K^+ dans les feuilles est occasionnellement associée à une plus grande tolérance à la salinité chez le blé et l'orge (Chen *et al.*, 2007b; Cuin *et al.*, 2008). À notre connaissance, trois études sur le riz seulement ont déterminé des QTLs pour la concentration de K^+ (Koyama *et al.*, 2001; Bonilla *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2004).

Une étude récente sur une population d'haploïde-doublés de blé, s'est proposée d'identifier des QTLs associés à des traits de tolérance à la salinité, de comprendre leur interférence et comment ils contribuent à cette tolérance tout en insistant sur leur valeur génétique pour la sélection assistée par marqueurs (Genc *et al.*, 2010). Dans cette étude, une corrélation génétique négative a été révélée entre la concentration de Na^+ et la biomasse des pousses sous stress salin. Seulement, cette concentration a été expliquée pour uniquement 18% de la variation génétique dans la biomasse des pousses. Ce qui laisse supposer que près de 80% de la variation génétique serait associé à des traits autres que l'exclusion de Na^+ . Ceci est loin d'être surprenant du moment où la tolérance à la salinité est gouvernée par plusieurs traits autres que l'exclusion de Na^+ (tolérance des tissus et ajustement osmotique), pouvant être contrôlés par plus d'un gène (Flowers, 2004; Munns et Tester, 2008). Pour la population étudiée, l'accumulation de Na^+ et K^+ semblent être sous des mécanismes de contrôle génétique séparés, et l'accumulation de K^+ n'est pas associée aux différences relatives à la production de biomasse sous stress salin. Des marqueurs moléculaires ont été proposés pouvant faciliter l'amélioration génétique pour la tolérance à la salinité chez le blé tendre (Genc *et al.*, 2010).

Les capacités de l'ingénierie des cultures tolérantes au sel se concrétisent aussi dans les approches transgéniques par manipulation de l'homéostasie ionique, de l'accumulation d'osmoprotectants, des protéines type *LEA* ainsi que la capacité à récupérer les ROS. Bien que la tolérance au stress abiotique est connue pour être gouvernée par plusieurs gènes, l'augmentation significative de la tolérance à la salinité peut être accomplie par les

manipulations à gène unique comme celles révélées par les plantes transgéniques surexprimant *Sos1*- (Shi *et al.*, 2003) et *Nhx1*- (Apse *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2001). Ces transgéniques sont capables de croître et fleurir à des concentrations en sel jusqu'à 200 mM NaCl (20 dS/m), dose mortelle pour les plantes sauvages. Une étude récente s'est proposé de tester si la surexpression de multiples gènes pourrait améliorer la tolérance au sel des plantes. Pour cela, six plantes transgéniques différentes d'*Arabidopsis* ont été produites sous stress salin qui sur-expriment respectivement *AtNhx1*, *Sos3*, *AtNhx1+Sos3*, *Sos1*, *Sos2+Sos3*, ou *Sos1+Sos2+Sos3*. Contrairement aux résultats des études précédentes, dans ce cas, seules les plantes transgéniques surexprimant *AtNhx1* n'ont montré d'augmentation significative de la tolérance à la salinité. En même temps, les plantes transgéniques surexprimant *Sos3* et *Sos1* ont montré une tolérance à la salinité accrue. Par ailleurs, pour les plantes transgéniques surexprimant *AtNhx1+Sos3*, *Sos2+Sos3*, *Sos1+Sos2+Sos3*, leur tolérance à la salinité semble similaire à celle des plantes transgéniques surexprimant soit *Sos1* soit *Sos3* seul (Yang *et al.*, 2009). Une surexpression du gène *Sos1* (Ajay *et al.*, 2008) et *Sos2* (Guo *et al.*, 2004), ont amélioré la tolérance au stress salin chez *Arabidopsis*.

Afin de clarifier les différences génomiques dans la régulation de l'homéostasie K^+/Na^+ et ROS entre deux espèces de peupliers tolérants (*Populus euphratica* Oliv.) et sensibles (*P. popularis*) au sel, une biotechnologie récente a permis une exploration du transcriptome foliaire des deux espèces en utilisant les puces à ADN (Affymetrix poplar genome array) (Ding *et al.*, 2010). *P. euphratica* a montré une plus grande capacité à maintenir l'homéostasie ionique et celle de ROS sous condition saline. Le contrôle de *P. euphratica* a présenté une plus grande abondance de transcription des gènes arbitrant l'antiport Na^+/H^+ ainsi que le transport et l'assimilation de K^+ , comparé à *P. popularis*. La sensibilité de *P. popularis* a été expliquée par sa faible capacité à traiter avec la production des ROS et la balance ionique au début du stress salin, d'où une surproduction des ROS dans les cellules foliaires suivie d'un dommage oxydatif en cas d'une salinité durable.

Aussi l'homéostasie de Cl^- a été récemment caractérisée en ayant révélé : l'activité de transport spécifique de Cl^- dans la voie métabolique symplastique, l'assimilation, le transport sur longue distance et la distribution de Cl^- chez des porte-greffes d'agrumes de type "*includer*" et "*excluder*" (Brumós *et al.*, 2010).

Concernant la transformation génétique des agrumes pour la tolérance à la salinité, peu de travaux ont été réalisés. L'obstacle majeur pour l'amélioration des agrumes par la

transformation génétique, serait le manque de gènes adéquats et utiles et qui soient isolés à partir du génome des *Citrus* (Peña *et al.*, 2007). Cervera *et al.* (2000) ont réussi à transformer des plantes de Citrange Carrizo (considéré comme un excellent porte-greffe très sensible au sel), avec le gène halotolérant *Hal2* (Murguía *et al.*, 1995) capable de supporter de très fortes concentrations en sel. Les plantes transgéniques ayant montré des niveaux de transcription élevés en analyses *Northern* ont été sélectionnées pour être testé comme porte-greffes de variétés d'agrumes sensibles, et ce dans des essais *in vivo* de tolérance au stress salin (communication personnelle). Selon Mademba-Sy *et al.* (2003) il existe une corrélation positive entre l'accumulation de proline et le degré de sensibilité au sel chez les citrus. Sous stress, toutes les espèces accumulent la proline et le gène responsable de sa synthèse, *P5CS* (Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthétase) est rapidement induit sous stress dans tous les tissus (Hong *et al.*, 2000). La surexpression du gène *P5Csa*, responsable de la synthèse de la proline a amélioré la tolérance à la sécheresse chez Citrange Carrizo à travers l'ajustement osmotique (Molinari *et al.*, 2004).

7-6-5- Gènes candidats

Le stress salin entraîne le déclenchement de plusieurs gènes comme ceux codant les facteurs de transcription impliqués dans le signal de transduction tels que les doigts de zinc et les protéines *Myb* (Sakamoto et Murata, 2002; Dai *et al.*, 2007), les gènes impliqués dans la biosynthèse d'osmoticum comme la choline mono-oxygenase (*Cmo*) et Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthétase (*P5CS*) (Subbarao *et al.*, 2001; Ueda *et al.*, 2004), et les gènes codant pour les protéines chaperonne comme le groupe des *LEA5* (Naot *et al.*, 1995).

La recherche de gènes candidats peut avoir plusieurs objectifs, soit la compréhension des mécanismes de tolérance, soit l'analyse de la diversité de séquence ou d'expression de ces gènes chez différents portes greffes ou variétés ayant différents niveaux de tolérance à la salinité, soit la transformation génétique. A ce titre, tous les gènes d'agrumes homologues à ceux déjà identifiés chez des espèces modèles comme *Arabidopsis* (Figure 11) constituent potentiellement des gènes candidats pour des programmes d'amélioration par transformation génétique. Ces gènes peuvent être classés en trois groupes fonctionnels majeurs : 1) ceux qui contrôlent l'assimilation et le transport du sel ; 2) ceux qui possèdent une fonction osmotique ou protectrice ; et 3) ceux qui permettent à la plante de croître plus rapidement dans un sol salin (Horie et Schroeder, 2004; Munns, 2005). Na^+ qui entre dans la cellule aura à prendre un des trois chemins (supposant qu'il ne peut être retenu dans le cytoplasme où il sera toxique) :

Na^+ peut se déplacer de façon symplastique au sein d'une cellule adjacente via le plasmodesme ; il peut être efflué en retour vers la paroi cellulaire ; ou il peut être compartimenté dans la vacuole. Le contrôle- dépendant de l'énergie- de l'efflux de Na^+ des cellules à travers les antiports de la membrane plasmique Na^+/H^+ *Sos1* est codé par le gène *Sos1* (antiport Na^+) (Zhu, 2003; Qiu *et al.*, 2004). *Sos1* est exprimé dans les cellules racinaires (Shi *et al.*, 2002).

La compartimentation a lieu à travers les antiports de la membrane vacuolaire Na^+/H^+ comme *Nhx1* (antiport Na^+) (Blumwald *et al.*, 2000; Bassil *et al.*, 2011). *Nhx1* est exprimé dans les racines et les feuilles et transporte sélectivement Na^+ dans la vacuole, aussi bien que K^+ dans les conditions non salines (Apse *et al.*, 2003). Chez le genre *Citrus* l'expression du gène *cNhx1* a été signalée sous stress salin et haute température. Il a été montré que l'activité de *AtNhx1* est contrôlée par la voie métabolique SOS (Qiu *et al.*, 2004). Chez *Arabidopsis*, *Nhx* est une famille de gènes. Parmi eux, *AtNhx2*, *AtNhx3*, *AtNhx4*, *AtNhx5*, sont exprimés dans des types de cellules spécifiques, mais sont plus abondants dans les racines et les pousses des jeunes plants. Ils transportent Na^+ ou K^+ à l'intérieur de la vacuole et ont probablement un rôle dans la régulation de K^+ ou du pH. *AtNhx3* est aussi un antiport fonctionnel responsable de la tolérance à la salinité en agissant comme médiateur des échanges K^+/H^+ (Liu *et al.*, 2008).

Les antiports vacuolaires Na^+/H^+ utilisent le gradient de proton généré par les pompes à protons H^+ -ATPase et H^+ -PPase (H^+ -inorganique pyrophosphatase) pour la séquestration de Na^+ dans la vacuole. De ce fait, H^+ -ATPase et H^+ -PPase sont essentiels pour la régulation de la séquestration vacuolaire (Chinnusamy *et al.*, 2006).

Hkt1 a été initialement identifié chez le blé (Schachtman et Schroeder, 1994). *AtNhx1* a été découvert à partir des séquences du génome d'*Arabidopsis* (Apse *et al.*, 1999; Gaxiola *et al.*, 1999). Le manque de K^+ induit l'expression de *Hkt1* (transporteur K^+ haute-affinité) chez le blé, indiquant sa fonction dans l'assimilation haute-affinité de K^+ , mais s'implique aussi dans le transport de Na^+ . Le gène *Hkt1* joue le rôle de médiateur pour l'influx de Na^+ à travers la membrane plasmique chez le blé, le riz et l'orge (Huang *et al.*, 2008). Les données physiologiques et moléculaires ont justifié que *AtHkt1* d'*Arabidopsis* facilite l'homéostasie de Na^+ chez les plantes et de là module l'état du nutriment K^+ (Rus *et al.*, 2004). Les mutations perturbant les fonctions du gène *AtHkt1* modifieront le transport de Na^+ des racines vers les pousses, et le taux K^+/Na^+ dans les racines (Rus *et al.*, 2004).

Une autre grande famille de gènes *Chx* (antiport de cations) demeure encore peu explorée. Cependant, deux isoformes *Chx10* et *Chx15*, se sont montrés impliqués dans la régulation de l'assimilation de K^+ par les vacuoles. Ils peuvent aussi transporter Na^+ , et leur expression est régulée négativement sous stress salin (Rus *et al.*, 2004). Il a été rapporté que les isoformes *AtChx17* et *AtChx23*, sont impliqués respectivement dans l'homéostasie de K^+ et le contrôle du pH chloroplastique (Pardo *et al.*, 2006).

Les molécules ayant une fonction protectrice incluent les petits composés organiques qui sont différemment appelés osmolytes, osmoprotectants ou solutés compatibles. A forte concentration, ces molécules interviennent dans l'ajustement osmotique, et à faible concentration, elles ont un rôle métabolique protecteur qui s'identifie dans la stabilisation des protéines solubles ou membranaires, et le maintien de la croissance à forte salinité (Rhodes *et al.*, 2002). Certes, les fonctions spécifiques de ces molécules sont encore incertaines chez les plantes supérieures. Les voies métaboliques et les gènes contrôlant la synthèse ou l'accumulation de ces molécules ont été étudiés (Nuccio *et al.*, 1999; Chen et Murata, 2002), avec une référence spécifique à la salinité (Rhodes *et al.*, 2002). Une augmentation dans la production de proline a été observée en réponse à un stress salin (Anjum, 2008; Mademba-Sy, 2004), à un stress hydrique (Laborem *et al.*, 1995) ou au froid (Purvis et Yelenosky, 1983). Plusieurs travaux ont montré des résultats positifs pour la tolérance à la salinité quand les plantes sont transformées avec des gènes codant pour des protéines protectrices ou des osmoprotectants (Chen et Murata, 2002; Gorham et Wyn Jones, 2002; Flowers, 2004).

Plusieurs études ont visé l'identification de gènes impliqués dans la tolérance à la salinité chez les agrumes. Ainsi, le gène désigné par *C-Lea5* a été isolé à partir de suspensions cellulaires et de feuilles d'orange Shamouti. Les résultats ont montré que le stress osmotique induit par un degré élevé en sel est responsable de l'augmentation du niveau de *C-Lea5*. Le clone cDNA de ce gène a montré une forte homologie (79,5%) avec le produit du gène *Lea5* du cotonnier induit par un stress hydrique, et avec une protéine hydrophile codée par *rd29B* chez *Arabidopsis* induite par la déshydratation et la salinité (Naot *et al.*, 1995).

Les gènes *CcCcc1*, *CcSlah1* et *CcICln1* qui sont putativement impliqués dans la régulation du transport du chlorure, ont été isolés et leur expression analysée en réponse au changement du statut nutritionnel de Cl^- et au stress salin chez deux types de porte-greffes ("exculer" et "includer" de Cl^-). Seul le gène *CcSlah1* a présenté une réponse significative au stress salin. Il a spécifiquement été induit par le stress salin chez Citrange Carrizo ("includer"- Cl^-), alors

qu'il a légèrement été réprimé chez mandarinier Cléopâtre ("excluser"-Cl⁻) (Brumós *et al.*, 2010). Quant au gène *ICln*, il a présenté une forte répression après une application de 4,5 mM Cl⁻ qui était spécifique au porte-greffe mandarinier Cléopâtre "excluser"-Cl⁻, suggérant son implication dans la régulation de l'homéostasie de Cl⁻ au niveau de la plante entière chez les plantes supérieures.

Chapitre I

Étude de la diversité génétique des porte-greffes d'agrumes utilisés en Tunisie

Telle est la loi du ciel dont la sage équité Sème dans l'univers cette diversité.

Corneille

I- Introduction

La Tunisie réunit un ensemble de conditions naturelles et économiques favorables à l'extension des agrumes, et présente donc un paysage diversifié en espèces agrumicoles. Cependant, face à une telle diversité le porte-greffe bigaradier (*Citrus aurantium* L.) demeure prépondérant du fait des ses qualités agronomiques et du succès qu'il a montré avec une large gamme de variétés. Malheureusement, continuer à utiliser ce porte-greffe menace sérieusement l'agrumiculture de notre pays à cause de la propagation de la maladie de la Tristeza un peu partout dans le bassin méditerranéen et du fait que la combinaison du bigaradier avec les variétés commerciales forme des arbres qui sont sensibles au virus de cette maladie (CTV). Il devient donc nécessaire de chercher des porte-greffes de substitution pouvant combiner des caractères de résistances aux maladies, en premier lieu à la Tristeza, des adaptations aux conditions particulières environnementales et une compatibilité avec la variété greffée. Outre les nouveaux porte-greffes qui peuvent être introduits, des programmes nationaux d'amélioration génétique pourront être entrepris. Ces programmes requièrent sans doute une connaissance de la diversité et des relations génétiques entre les individus constituant le germoplasme tunisien. Malgré une propagation clonale (apomixie et multiplication par graines), la variation morphologique présentée par les accessions locales de bigaradier est remarquable. D'autres types de porte-greffes et d'agrumes non greffés sont aussi utilisés traditionnellement, particulièrement dans les oasis; ces arbres sont rattachés aux groupes des orangers, des limettiers et des citronniers. Les porte-greffes traditionnels tunisiens ont montré une bonne adaptation aux conditions défavorables régionales relatives au sol et au climat. D'où l'importance d'un tel germoplasme et la nécessité de sa bonne gestion qui offrira de grandes possibilités de son intégration dans les programmes d'amélioration génétique des porte-greffes. La présente étude vient dans ce contexte, présenter une analyse de la diversité génétique des porte-greffes d'agrumes utilisés en Tunisie et étudier les facteurs régissant cette diversité.

II- Matériel et Méthodes

2-1- Matériel végétal

Pour l'étude de la diversité génétique des porte-greffes d'agrumes utilisés en Tunisie, une prospection a été réalisée dans différentes régions du pays, incluant la région du Cap-Bon qui

regroupe les principaux centres de production d'agrumes: Nabeul, Menzel Bouzelfa, El Gobba, Beni Khaled (dont les jardins sont embaumés par les plantes à parfum), et Hammamet (centre très important pour la production du citronnier). D'autres zones au nord, au sud ou dans les oasis, sont aussi impliquées dans la production d'agrumes pour le marché local ou la consommation domestique. Des plantations ont vu le jour dans de nouvelles zones prometteuses situées dans les environs de Tunis : Mornag, La Soukra, Manouba, la péninsule de Sidi Bou Said..., la corniche de Bizerte, et les différents points le long de la côte au sud de Bir Bou Reguba (Sousse, Mahdia, Monastir), la plaine de Sidi Bouzid et Kairouan et quelques localités abritées de la région intermédiaire du Nord (Béja, Bou Selem, etc.). Les porte-greffes traditionnels, ainsi que les variétés locales parfois cultivées sur leurs propres racines ont été plus particulièrement ciblés lors des collectes, étant donné leur bonne adaptation aux conditions locales.

L'échantillonnage a été fait dans les différents sites géographiques, selon la diversité morphologique observée ou attestée par le témoignage des agriculteurs. Au total, deux cent une accessions ont été collectées pour l'analyse de la diversité. Ces accessions appartiennent aux quatre espèces d'agrumes *C. aurantium*, bigaradier; *C. sinensis*, oranger; *C. limon*, citronnier et *C. aurantifolia*, lime.

Le matériel végétal régional prospecté avait plusieurs origines. Un arbre est soit issu de semis, soit produit par greffage à partir de baguettes (clonage végétatif), ou encore par marcottage (clonage végétatif, cas des limettiers et des citronniers).

Pour compléter notre étude et dans un but de comparer les géotypes tunisiens avec des accessions de référence représentatives de la diversité globale des agrumes cultivés, un jeu de 23 variétés (Tableau 6) a été sélectionné. Ces variétés correspondent aux références des différentes espèces collectées en Tunisie, auxquelles ont été ajoutés les trois principaux taxons ancestraux des agrumes cultivés (*C. maxima*, *C. medica* et *C. reticulata*). Elles proviennent des banques de germoplasmes Espagnoles (IVIA) et Françaises (INRA/CIRAD).

Tableau 6- Les variétés d'agrumes de référence (23 accessions) représentant les différents taxons

Génotype (Nom commun)	Nom latin (système Swingle)	Nom latin (système Tanaka)	N° d'accension
Bigaradier Granito	<i>C. aurantium</i> L.	<i>C. aurantium</i> L.	ICVN* 0110015
Bigaradier Bouquet de fleurs	<i>C. aurantium</i> L.	<i>C. aurantium</i> L.	IVIA**– 139
Bigaradier Sevillano	<i>C. aurantium</i> L.	<i>C. aurantium</i> L.	IVIA** – 117
Mandarine Willow Leaf	<i>C. reticulata</i> Blanco	<i>C. deliciosa</i> Ten.	SRA***- 133
Orange Tarrocco	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	IVIA**– 271
Orange Maltaise	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	IVIA**– 393
Orange Moro	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	IVIA**– 44
Orange Washington Navel	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	IVIA**– 222
Orange Valencia Late	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	IVIA**– 363
Excelsa	<i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	<i>C. excelsa</i> Wester	IVIA**– 167
Lime Mexicaine	<i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	<i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	SRA***– 140
Limonette de Marrakech	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	<i>C. limetta</i> Risso	IVIA**– 484
Lime Douce de Palestine	<i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	<i>C. limettioides</i> Tan.	IVIA**– 305
Lime Rangpur	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	<i>C. limonia</i> Osbeck	SRA***- 777
Citronnier Volkamer	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	<i>C. limonia</i> Osbeck	IVIA**– 432
Macrophylla ou Alemow	<i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	<i>C. macrophylla</i> Wester	IVIA**– 288
Lime Kalpi	<i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	<i>C. webberii</i> Wester	IVIA**– 234
Lime Karna	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	<i>C. karna</i> Raf.	IVIA**– 242
Citronnier Rough	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	<i>C. jambhiri</i> Lush.	IVIA**– 333
Citronnier Eureka	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	SRA***- 4
Citronnier de Lisbonne	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	SRA***- 16
Pamplemoussier Pink	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	IVIA**– 275
Cédrat de Corse	<i>C. medica</i> L.	<i>C. medica</i> L.	SRA***- 613

*International Citrus variety numbering, **Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, ***Station de Recherches Agronomiques Inra-Cirad de San Giuliano

2-2- Méthodologie

2-2-1- Extraction d'ADN

Les ADN totaux des accessions d'agrumes ont été extraits selon le protocole MATAB modifié (Risterucci *et al.*, 2000). Pour chaque accession l'ADN total a été extrait à partir de 500 mg de feuilles fraîches broyées dans l'azote liquide. Cinq millilitres de tampon d'extraction TE1 sont rajoutés au broyat afin de libérer les ADN totaux. Le mélange est vortexé et ensuite incubé à 74°C durant 20 minutes en agitant légèrement. Une fois les tubes refroidis à température ambiante, et afin d'éliminer les protéines, 5 ml du mélange chloroforme/alcool isoamylique (24/1; v/v) ont été ajoutés au mélange. Placés sous agitation durant 10 min, les échantillons sont centrifugés à 9000 g pendant 15 min. La phase aqueuse contenant les acides nucléiques est récupérée et additionnée de 5 ml d'isopropanol, puis re-centrifugée à 9000 g pendant 20 min (à 4°C). Le culot obtenu (ADN total) est séché par évaporation rotative sous vide et est ensuite re-suspendu dans 400 µl de TE1. La qualité des extraits d'ADN total obtenus est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 0.8% dans du tampon Tris-Acétate 1x (TAE1x). Deux µl de l'ADN total extrait sont additionnés de 1 µl de bleu de charge (10x) et 8 µl d'eau déminéralisée, puis déposés dans le gel. Après électrophorèse du gel durant 45 min à 120V, ce dernier est placé dans un bain de bromure d'éthidium (BET) (10µg/ml) durant 15 min puis il est visualisé sous UV. Les concentrations d'ADN total ont été quantifiées par fluorimètre (Hoefer). Le fluochrome utilisé, le Hoechst 33258 (2-[2-(4-Hydroxyphenyl)-1-6-benzimidazolyl]-6-(1-méthyl-4-piperazyl)-benzimidazole-trihydrochloride) se lie spécifiquement aux bases azotées A et T de l'ADN. Il absorbe, s'excite à 360nm et émet un signal fluorescent à 470nm. La concentration d'ADN d'un échantillon donné est proportionnelle à la quantité de fluorescence qu'il émet. Deux µl de l'échantillon d'ADN extrait sont mélangés à 2 ml du tampon photosensible contenant 10 µl de réactif de Hoechst H33258, 10 ml de tampon Tris NaCl EDTA (TNE 10x) et 90 ml d'eau déminéralisée.

2-2-2- Analyse moléculaire

2-2-2-1- Les marqueurs moléculaires SSRs

Les marqueurs SSRs ont été choisis pour notre étude pour plusieurs raisons. En effet ces marqueurs ont l'avantage d'être de nature co-dominante, ce qui fait que les individus homozygotes peuvent parfaitement être distingués des individus hétérozygotes. Ils sont également très polymorphes, spécifiques et bien répartis dans le génome. Enfin la

reproductibilité des analyses est très bonne, ce qui constituait un avantage important dans le cas de notre travail, qui a été conduit dans différents laboratoires.

Vingt marqueurs microsatellites nucléaires (SSRs) (Tableau 7) ont été sélectionnés à partir d'études antérieures sur des banques de germoplasme de l'INRA/CIRAD et de l'IVIA et ce sur la base de leurs caractéristiques spécifiques, notamment la taille de l'amplification attendue (entre 152 pb et 342 pb) et leurs qualités hétérozygote et hautement polymorphe (afin d'éviter le phénomène de redondance et de discriminer au mieux les individus nucellaires des zygotiques). Le critère principal de sélection était le nombre d'allèles. Dix sept SSRs ont été choisis à partir de banques génomiques développées par Froelicher *et al.* (2008), et trois à partir de base de données EST développées par Luro *et al.* (2008).

Tableau 7- Liste des 20 couples d'amorces SSRs utilisés

Nom du locus	Accession No. EMBL	Séquence de l'amorce Forward	Séquence de l'amorce Reverse	Motifs Répétés	Ta (°C)
<i>mCrCIR02A09</i>	FR677568	ACAGAAGGTAGTATTTTAGGG	TTGTTTGGATGGGAAG	(GA)9	55
<i>mCrCIR03C08</i>	FR677576	CAGAGACAGCCAAGAGA	GCTTCTTACATTCCTCAA	(GA)16	55
<i>mCrCIR02D04B</i>	FR677564	CTCTCTTTCCCCATTAGA	AGCAAACCCACAAAC	(GT)10(GA)7	50
<i>mCrCIR02D09</i>	FR677569	AATGATGAGGGTAAAGATG	ACCCATCACAAAACAGA	(GA)10	55
<i>mCrCIR03D12a</i>	FR677577	GCCATAAGCCCTTTCT	CCCACAACCATCACC	(GT)10(GA)6	50
<i>mCrCIR03G05</i>	FR677578	CCACACAGGCAGACA	CCTTGGAGGAGCTTTAC	(GAAA)3(GA)11	50
<i>mCrCIR02G12</i>	FR677575	AAACCGAAATACAAGAGTG	TCCACAAACAATACAACG	(GA)14	55
<i>MEST121</i>	DY275927	TCCCTATCATCGGCAACTTC	CAATAATGTTAGGCTGGATGGA	(TAA)9	55
<i>MEST431</i>	DY285140	GAGCTCAAAACAATAGCCGC	CATACCTCCCCGTCCATCTA	(CAG)7	55
<i>MEST458</i>	DY283417	CCCCCTCTTTTCTCTTCCA	TTCTGGGCTGGTAGGTTTAC	(TC)12	55
<i>mCrCIR01C06</i>	AJ567393	GGACCACAACAAGACAG	TGGAGACACAAAGAAGAA	(GA)9	50
<i>mCrCIR01C07</i>	AJ567394	GTCACCTACTCTCGCTCTTG	TTGCTAGCTGCTTTAACTTT	(CT)10	55
<i>mCrCIR01D06a</i>	AM489734	GATCAAAACATTATTCCAA	TTTTTCATCAACAAGACTG	(CA)12	50
<i>mCrCIR01E02</i>	AM489735	TGAATGGTACGGGAAATGC	CAGGGTTCGGTGGAGAGGAT	(GA)16	55
<i>mCrCIR01F04a</i>	AM489736	AAGCATTTAGGGAGGGTCACT	TGCTGCTGCTGTGTTGTCT	(CT)13CC(CT)7	55
<i>mCrCIR01F08a</i>	AM489737	ATGAGCTAAAGAGAAGAGG	GGACTCAACACAACACAA	(GAAT)6	50
<i>mCrCIR01H05</i>	AJ567401	AAAACAACCAAAAGGACAAGATT	TTCAAACCTAAACAAACCAACTCG	(GA)9	55

Nom du locus	Accession No. EMBL	Séquence de l'amorce Forward	Séquence de l'amorce Reverse	Motifs Répétés	Ta (°C)
<i>mCrCIR06B05</i>	AM489744	GAACGATGGAATGAAGTG	ATGTTGATTACGAGACCTT	(GA)26	55
<i>mCrCIR07D06</i>	FR677581	CCTTTTCACAGTTTGCTAT	TCAATTCCTCTAGTGTGTGT	(TAAT)4N(TG)8(GA)11	55
<i>mCrCIR07D07</i>	AM489748	GCTGATGATACGCACGAACC	CACAACGCCAAAAACGACTC	(GA)10	55

Ta: température d'hybridation. MEST: Marqueur sélectionné à partir des marqueurs de séquence exprimée (EST) chez la Clémentine. mCrCIR: Microsatellite sélectionné à partir de séquences génomiques chez *C. reticulata*

2-2-2-2- Les marqueurs mitochondriaux

Par ailleurs, outre la transmission du génome nucléaire, on s'est intéressé à l'héritage du génome mitochondrial de nos génotypes. La transmission maternelle de l'ADN mitochondrial semble être le principal mode d'héritage chez les plantes (Barr *et al.*, 2005). Chez les agrumes, il a été montré que le cytoplasme est maternellement hérité (Green *et al.*, 1986; Yamamoto *et al.*, 1993), et qu'il y a plus de polymorphisme dans les génomes chloroplastiques que dans les génomes mitochondriaux (Lotfy *et al.*, 2003). Une étude récente a révélé de nouvelles informations sur la phylogénie maternelle des agrumes à travers de nouveaux marqueurs PCR mitochondriaux (Froelicher *et al.*, 2011). Trois de ces marqueurs ont servi à l'analyse de la phylogénie maternelle du germoplasme tunisien, nad2/4-3, nad5/2-1 et nad7/1-2 (Froelicher *et al.*, 2011), le 4^{ème} marqueur indel mitochondrial utilisé (rrn5/rrn18-1) était préalablement développé par Duminil *et al.* (2002) (Tableau 8).

Tableau 8- Liste des 4 paires d'amorces indel mitochondriales utilisées pour l'analyse des accessions d'agrumes collectées et espèces apparentées (*C. reticulata*, *C. maxima*, *C. medica*)

Nom du locus	Source	Amorce Reverse	Séquence (5'-3')	Amorce Forward	Séquence (5'-3')	Position*/ Origine d'ADN	Taille	Ta (°C)
<i>rrn5/rrn18-1</i>	Duminil <i>et al.</i> , 2002	<i>rrn5</i>	gaggtcgggaatgggatcggg	<i>rrn18-1</i>	gggtgaagtcgtaacaaggt	161129-161383/ <i>A. thaliana</i>	255-260	50
<i>nad2/4-3</i>	Froelicher <i>et al.</i> , 2011	<i>nad2/4</i>	ttcagataacacgcacc	<i>nad2/3</i>	gacctcacctcaaatca	330666-331566/ <i>A. thaliana</i>	239-258	50
<i>nad5/2-1</i>	Froelicher <i>et al.</i> , 2011	<i>nad5/2</i>	ctggttagatgcgtgg	<i>nad5/1</i>	acacggctcaccaac	142368-142643/ <i>A. thaliana</i>	273-283	50
<i>nad7/1-2</i>	Froelicher <i>et al.</i> , 2011	<i>nad7/1</i>	ttgatataggctcgct	<i>nad7/2</i>	ggaacatagcataggg	132914-133077/ <i>A. thaliana</i>	134-159	50

* Position de l'extrémité 5' de chaque amorce sur le génome mitochondrial

2-2-2-3- Analyse de la diversité du germoplasme Tunisien par marquage radioactif ($\gamma^{33}P$) des loci microsatellites

Les ADN des 201 accessions collectées ont été amplifiés par PCR à l'aide des 20 amorces microsatellites sélectionnées. Avant l'amplification par PCR, les extrémités 5' des amorces "Reverse" ont été radiomarquées avec du ($\gamma^{33}P$) ATP, en présence de la T4 polynucléotide kinase. Les réactions PCR pour les analyses SSRs ont été réalisées dans un volume total de 20 μ l contenant 25 ng d'ADN génomique, 0.2 μ M de chaque amorce, 200 μ M de chaque dNTP, 2 μ l de tampon 10X PCR (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 0.01% glycérol), et 0.75 unités de l'enzyme Taq polymérase. Les réactions PCR ont été effectuées dans un thermocycleur de type PTC-100TM MJ Research, Inc. Le programme d'amplification débute par une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 min suivie de 35 cycles d'amplification de: dénaturation à 94°C pendant 30s, hybridation au T_m du couples d'amorces (50–55°C) pendant 1 min et élongation à 72°C pendant 30s. A la fin des cycles, une dernière élongation à 72°C pendant 4 min est appliquée. Les échantillons amplifiés ont été gardés à 4°C avant d'être analysés.

Aux 20µl des solutions de réaction PCR, on ajoute 20 µl de tampon de charge dénaturant (98% formamide (v/v), 10 mM EDTA pH 8.0, 0.25% (w/v) bleu de bromophénol, 0.25% (w/v) xylène cyanol) à chaque échantillon, le mélange est dénaturé à 92°C pendant 5 min et gardé à 70°C durant le chargement du gel.

L'électrophorèse est effectuée en conditions dénaturantes sur un gel de polyacrylamide 5% (acrylamide/bisacrylamide 19:1; 40% (w/v), urée 7.5M) dans un tampon TBE 0.5X. 60 ml sont coulés entre deux plaques de verre espacées de 0.4 mm et polymérisés avec du persulfate d'ammonium (249µl d'une solution à 10% (p/v)) et du TEMED (30µl).

Après une pré-migration de 30-45 minutes à 60 W, 6 µl de produit d'amplification de chaque échantillon sont déposés sur gel. La migration se fait à une puissance électrique constante de 60W durant 1h 30min à 2h 30min, en fonction de la taille attendue des produits d'amplification. Après électrophorèse, les gels sont ensuite séchés sur une membrane (papier Wattmann) pendant 45 min à 80°C dans un sécheur de gels (Fisherbrand FSGD-5040, UK) puis exposés en chambre noire à des films autoradiographiques (Kodak Biomax-MR, US) dans une cassette hermétique à l'air et à la lumière. Pour les marqueurs EST des films plus sensibles ont été utilisés (LifeRay CRT7, medical imaging film).

Afin de minimiser les erreurs de génotypage et pour les comparaisons ultérieures, tous les gels ont inclus un individu de contrôle (bigaradier "Granito") répété 4 fois par gel, et un marqueur de poids moléculaire.

Le film est laissé impressionner durant 48 h minimum.

La révélation en chambre noire est réalisée en trempant le film successivement dans un bain de nitrate d'argent quelques secondes à quelques minutes selon le niveau de radioactivité, dans un premier bain de rinçage (eau), puis dans un bain de fixation pendant quelques minutes et pour finir dans un deuxième bain de rinçage (à l'eau). Les films sont mis à sécher à l'air ambiant.

2-2-2-4- Analyse de la diversité du germoplasme Tunisien et du germoplasme de référence avec des marqueurs SSRs et mitochondriaux par électrophorèse capillaire

En appliquant les mêmes 20 marqueurs nucléaires SSRs et les 4 marqueurs Indel mitochondriaux, des ADN représentant les différents génotypes multi-locus (MLGs) déduits de la 1^{ère} analyse ont été ré-analysés en présence des 23 accessions de référence. Ces analyses

ont été menées en électrophorèse capillaire (CEQ™ 8000 Genetic Analysis System) et répétées deux fois.

Les réactions PCR ont été réalisées avec 2 ng/μl d'ADN matrice, 0.2 mM de dNTPs, 0.2 μM d'amorce forward marquée avec le colorant WellRED, 0.2 μM d'amorce reverse, de tampon 10X PCR, 1.5 mM de MgCl₂ et 0.5 U/μl de Taq polymérase. Les conditions d'amplification PCR étaient comme suit: 5 min à 94 °C; 40 cycles de: 30 s à 94°C, 30 s à 55°C (ou 50°C en fonction de l'amorce) et 1 min à 72°C; et 4 min à 72°C.

2-2-3- Analyse de la diversité

Pour chaque paire d'amorces, les bandes (PAGE) ou les pics (électrophorèse capillaire) ont été notés comme données alléliques. Les données ont été vérifiées par double lecture et les génotypes à profils douteux systématiquement ré-analysés.

Analyse des dissimilarités

Les données ont été utilisées pour calculer une matrice des dissimilarités à l'aide de l'indice 'Simple matching' développé pour l'étude des données alléliques.

$$d_{ij} = 1 - \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L \frac{m_l}{\pi}$$

Où :

d_{ij} : dissimilarité entre les individus i et j

L : nombre de locus

π : ploïdie

m_l : nombre d'allèles assortis pour le locus l

La matrice de dissimilarités a ensuite été utilisée pour construire un dendrogramme avec la méthode du *Neighbor-joining* développée par Saitou et Nei (1987), avec pour principe le regroupement séquentiel des accessions voisines (déclarant les éléments i et j comme voisins quand la dissimilarité entre i et j est la plus faible) en minimisant la longueur totale de l'arbre. La robustesse des nœuds a été testée en appliquant 1000 ré-échantillonnages (bootstraps).

Ces analyses ont été faites à l'aide du logiciel DARwin version 5.0.158 (Dissimilarity Analysis and Representation for Windows, <http://darwin.cirad.fr/darwin>) (Perrier *et al.*, 1999; Perrier et Jacquemoud-Collet, 2006). DARwin 5.0158.

Analyse de la diversité génétique

Plusieurs paramètres ont été calculés pour décrire la diversité de notre échantillonnage et son organisation, dans son ensemble ou dans les quatre groupes variétaux rencontrés en Tunisie (bigaradier, orange, citron, lime).

- Le nombre d'allèles (n)

Le nombre moyen d'allèles par locus (A) a été calculé comme suit:

$A = \text{Nombre total d'allèles détectés} / \text{nombre de locus examinés}$

- Le nombre de génotypes multilocus distincts (MLGs) a été identifié pour l'ensemble des marqueurs.

Pour évaluer le taux de clonalité globale de notre échantillon, l'*index de diversité clonale G/N* a été calculé, où G étant le nombre de MLGs et N le nombre total des individus génotypés (Halkett *et al.*, 2005; Arnaud-Haond *et al.*, 2007).

- Les fréquences alléliques

- La richesse allélique

Le nombre d'allèles observé dans une population ou un échantillon est fortement lié à son effectif. Or le nombre d'individus analysé est très variable entre les différents groupes variétaux. Pour notre cas, l'estimation de l'indice R de richesse allélique avec Fstat 2.9.3.2 (Goudet, 2001) a été effectuée afin de pouvoir comparer le nombre d'allèles (et par conséquent la diversité) des différents groupes variétaux sans se préoccuper du biais lié à l'effectif de la population. Cet indice se base sur le plus petit nombre d'individus génotypés (8 individus diploïdes dans notre cas) pour un locus et pour un groupe.

- Les taux d'hétérozygotie observés et attendus

Un individu diploïde est hétérozygote à un locus donné s'il présente à ce locus deux allèles différents. En revanche, si ces allèles sont identiques, l'individu est homozygote à ce locus. L'hétérozygotie mesure le taux d'hétérozygotes dans une population. Elle est aussi une mesure largement utilisée dans les études de diversité génétique que ce soit au niveau de la population ou de l'individu (Kaeuffer, 2008).

L'hétérozygotie observée H_o (indice de diversité de Nei, 1973) correspond à la fréquence mesurée des hétérozygotes (nombre d'individus hétérozygotes pour un locus) divisée par le nombre total d'individus étudiés.

Le taux d'hétérozygotie attendue H_e est calculé à partir des fréquences alléliques théoriques dans la même population sous l'hypothèse que cette population est en panmixie. Il correspond à la probabilité pour que deux allèles tirés au hasard soient différents, et est calculé pour un locus donné à i allèles sans biais d'échantillonnage selon Nei (1978) d'après la formule:

$$H_e = 1 - \sum_{n=1}^n f_n^2$$

Si plusieurs loci sont considérés, l'hétérozygotie moyenne est la moyenne arithmétique de toutes les valeurs de H_e .

- Les indices de fixation de Wright

La répartition de la diversité ou la structuration des populations sont souvent caractérisées par les indices de fixation F de Wright (1969), d'après les formules de Weir & Cockerham (1984).

L'indice de fixation F_{IS} mesure la différenciation de l'hétérozygotie des individus à l'intérieur d'une sous-population (S) et est calculé selon la formule:

$$F_{IS} = (h_e - h_o) / h_e = 1 - (h_o / h_e)$$

avec h_o , l'hétérozygotie observée et h_e l'hétérozygotie attendue. Cet indice est souvent relié à la consanguinité ($F_{IS} < 0$: hétérozygotie excédentaire, $F_{IS} = 0$: population à l'équilibre de Hardy-Weinberg ; $F_{IS} > 0$: déficit d'hétérozygotes)

L'indice de fixation F_{IT} mesure la différenciation de l'hétérozygotie des individus à l'intérieur de l'ensemble de la population (T). Il rend compte de la dérive génétique en plus de l'écart à la panmixie dans la sous-population.

- Les paramètres de différenciation F_{ST} et G_{ST}

Wright (1978) a défini l'indice F_{ST} (variance standardisée) comme l'hétérogénéité des fréquences alléliques entre subdivisions d'une population. Cet indice permet de mesurer la différenciation entre sous-populations à partir du polymorphisme génétique en estimant la corrélation entre allèles dans une sous-population par rapport à l'ensemble des sous-populations (dans le cas de notre travail un groupe variétal par rapport à l'ensemble de l'échantillon); La différenciation des populations est calculée en fonction des paramètres de fixation de Wright.

$$F_{ST} = 1 - \frac{(1 - F_{IT})}{(1 - F_{IS})}$$

D'après Wright, 1978:

$0 < F_{ST} < 0,05$	$0,05 < F_{ST} < 0,15$	$0,15 < F_{ST} < 0,25$	$F_{ST} > 0,25$
Différenciation faible	Différenciation modérée	Différenciation importante	Différenciation très importante

L'index G_{ST} de Nei est également une mesure de différenciation entre sous-populations et a été calculé afin de mesurer la différenciation génétique aux loci multialléliques (Nei, 1977). Il s'agit d'une redéfinition du F_{ST} de Wright qui s'écrit en fonction des diversités génétiques à plusieurs locus multialléliques:

$$G_{ST} = 1 - H_S/H_T$$

où H_S étant la moyenne des diversités génétiques intra-populations sur toutes les sous-populations et H_T la diversité génétique totale en considérant l'ensemble des sous-populations (S) comme une seule population.

L'erreur standard sur les paramètres F a été estimée par la méthode de ré-échantillonnage dite du jack-knife (Weir, 1990) sur les locus et sur les populations. Le Jackknife sur les locus (Weir, 1996) est une procédure numérique qui consiste à éliminer un par un, chaque locus et à recalculer ensuite à partir du nouveau jeu de données réduit les différents paramètres afin de calculer les moyennes et les variances pour chacun des paramètres. Ceci permet d'obtenir un intervalle de confiance autour des estimations de chaque paramètre.

L'analyse des différents paramètres et indices de fixation décrivant la diversité génétique et son organisation au sein et entre les quatre groupes variétaux d'agrumes trouvés en Tunisie (bigaradier, oranger, citronnier et limettier) a été effectuée avec les logiciels GENETIX version 4.05.2 (<http://www.genetix.univ-montp2.fr/genetix/genetix.htm>) (Belkhir *et al.*, 1996-2004) ainsi que le programme FSTAT version 2.9.3 (<http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>) (Goudet, 2001).

III- Résultats

3-1- Résultats de la prospection, diversité et appellations locales des accessions d'agrumes utilisées comme porte-greffes

Les résultats de la collecte des accessions d'agrumes utilisées comme porte-greffes dans chaque région de la Tunisie sont détaillés dans la partie Annexes (Annexe I) et la figure 13. Au total 169 bigaradiers, 12 orangers francs de pied, 12 citronniers francs de pied et 8 limettiers ont été collectés.

Certains porte-greffes et variétés ont été reportés comme remarquables pour leur tolérance au stress, en particulier dans les vergers du Cap-Bon : des orangers Meski (doux) utilisés franc de pied dans une exploitation où la salinité des eaux est montée jusqu'à 5g/l, un cultivar local de lime, inopportunément, appelé "citron Beldi" par les producteurs ainsi que divers bigaradiers utilisés dans des doubles greffes bigaradier/citronnier/orange Maltaise. Les limes, en particulier les limes "*chiiri*" sont très bien adaptées aux conditions oasiennes, ce qui a fait d'elles le porte-greffe le plus populaire et le plus utilisé au sud et dans les oasis (Tozeur, Gafsa, Gabès, Nefta).

Le bigaradier (*C. aurantium* L.) est certainement le porte-greffe d'agrumes le plus répandu et le plus utilisé en Tunisie, pour lequel 169 accessions ont été collectées. La majorité de ces accessions étaient non greffées. Les autres accessions se présentaient sous forme de rejet de bigaradier greffé. Certains des échantillons ont été pris sur des arbres très âgés (entre 120 et 150 ans).

Le bigaradier, communément appelé "Ezharr" (relatif à la fleur), est utilisé aussi bien pour la production du néroli que celle d'eau de fleur d'oranger. De plus, dans les vergers d'agrumes, les bigaradiers servent de pollinisateurs, et leurs fruits sont transformés en marmelade. La majorité des bigaradiers collectés appartiennent à deux "types" définis par leur origine et le parfum de leurs fleurs: le bigaradier ordinaire "Ezharr *el Arbi*" (*arbi* du mot arabe/local), en arabe - الزهر العربي أو الزهر العادي - épineux avec des fleurs très parfumées; et le bigaradier appelé "Ezharr *Souri*", (*souri* pour dire étranger), - الزهر السوري - qui est moins parfumé que le précédent mais très productif.

D'autres noms attribués par les agriculteurs se rapportent à la morphologie du fruit, comme '*Chiiri*'. Ce nom est relatif à des fruits de bigaradiers comestibles dont la forme rappelle celle

des graines d'orge (شعير). D'autres variétés sont reconnues selon leurs caractéristiques morphologiques (fruits aplatis, petits fruits, etc), mais ne portent pas de noms particuliers.

Douze accessions représentent les orangers non greffés. Six d'entre elles, issues de semis, sont désignées par "Meski Kalb". L'appellation locale "*meski*" veut dire doux, et "*kalb*" traduit le mot "graine". Les six noms d'accessions restant se réfèrent à la qualité du fruit: "Chroubou" pour l'orange de couleur rouge; "Chammème hlou" pour l'orange douce très sucrée, et "Chammème karess" pour l'orange acide.

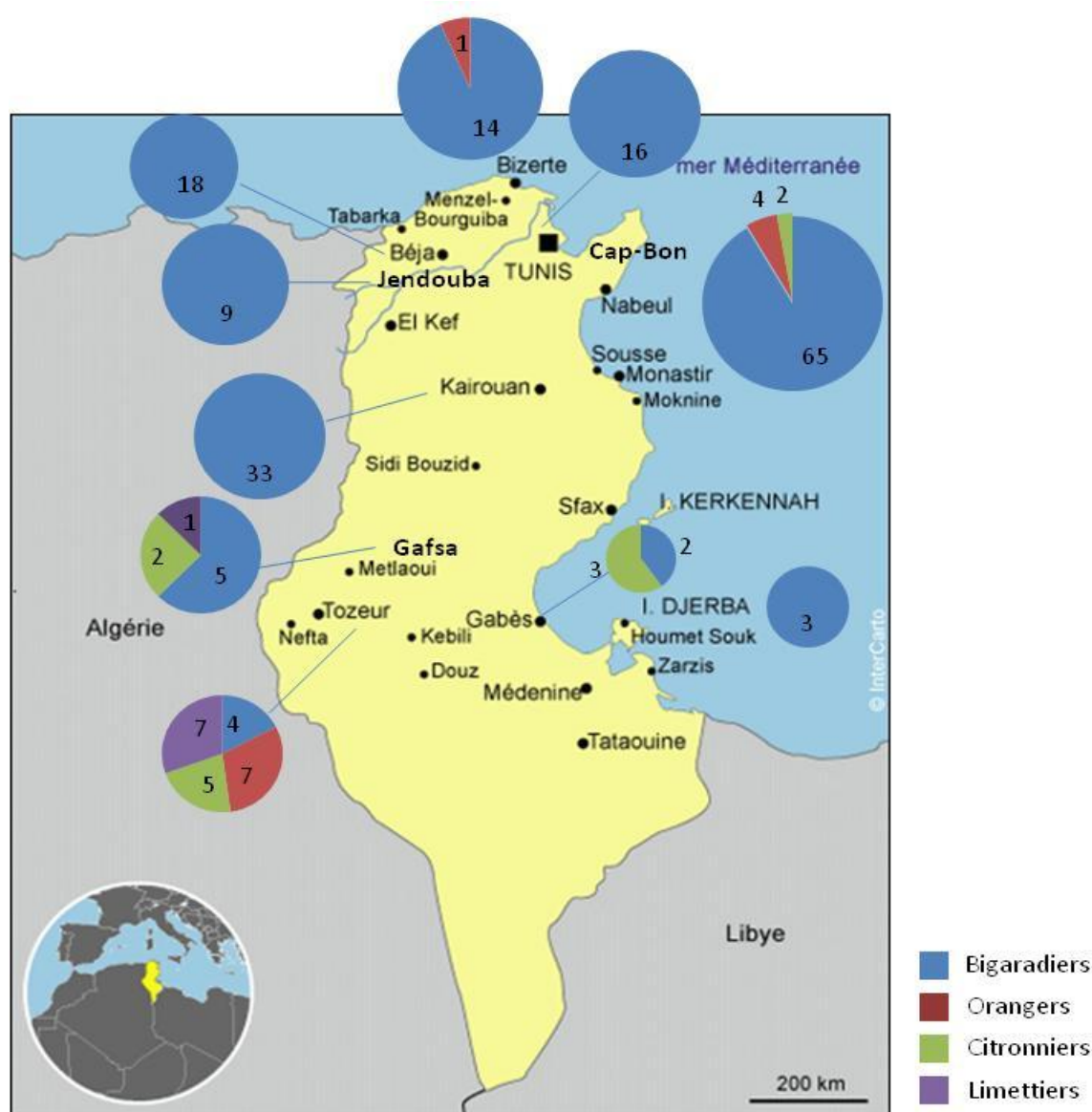


Figure 13. Distribution géographique des accessions Tunisiennes collectées.

Le nombre d'accessions de chaque espèce est indiqué dans les secteurs correspondants aux principales régions de collecte. Une liste complète, incluant les noms, lieux de collecte et principales caractéristiques des accessions, est présentée en Annexes (Annexe I).

Douze accessions forment le groupe des citronniers non greffés. Il s'agit pour la plupart de variétés locales. A Menzel Bouezelfa (Cap-Bon), un citronnier de la région est dans certains cas utilisé comme porte-greffe pour la variété d'oranger "Maltaise". Plusieurs noms sont attribués par les agriculteurs pour désigner certaines accessions particulières: "*ordinaire*", "*Beldi*" du mot "*bled*", "*Arbi*" pour une variété locale tolérante au mal secco et "*Chiiri*" par référence à la forme du fruit.

Huit accessions représentent les limes. On y trouve les limes douces, les limes "*Arbi*" et les limes autochtones "*Chiiri*". Les noms donnés par les agriculteurs à certaines accessions qualifient certains caractères spécifiques comme "*Chiiri*" en référence à la forme du fruit. Ces limes "*Chiiri*" constituent le porte-greffe le plus populaire et le plus utilisé dans le sud tunisien, principalement dans les oasis (Tozeur, Gafsa, Gabes, Nefta). Dans ces contrées, citronniers et limes "*Chiiri*" sont les porte-greffes d'agrumes les plus intéressants, traditionnellement utilisés. Non greffées, ces limes sont propagées par marcottage, ayant montré une adaptation remarquable aux conditions abiotiques des oasis, notamment la température élevée, le stress salin et le manque d'eau, pendant que les bigaradiers ont montré des symptômes de déficience clairs.

3-2- Diversité génétique du germoplasme tunisien

3-2-1- Diversité allélique et son organisation

Une première analyse des 201 accessions et d'un témoin (bigaradier Granito) a été effectuée au laboratoire GPTRG (Grand Plateau Technique Régional de Génotypage, CIRAD, UMR AGAP, Montpellier) par marquage radioactif ($\gamma^{33}\text{P}$) pour les 20 loci microsatellites nucléaires sélectionnés.

Pour chaque accession étudiée on a obtenu un profil di-allélique. Un total de 120 allèles a été identifié à partir des 20 loci analysés. Le nombre d'allèles moyen par locus microsatellite varie entre 3 (*mCrCIR06B05*) et 10 (*mCrCIR03C08*) avec une moyenne de six (Tableau 9).

Tableau 9. Nombre d'allèles par locus et taille des fragments amplifiés pour chaque marqueur microsatellite analysé (marquage $\gamma^{33}\text{P}$) sur le germoplasme local (201 accessions)

Nom du locus	Nombre d'allèles par locus pour le germoplasme tunisien (marquage radioactif)	Taille des fragments amplifiés
<i>mCrCIR02A09</i>	9	150-180
<i>mCrCIR03C08</i>	10	192-250
<i>mCrCIR02D04B</i>	4	196-222
<i>mCrCIR02D09</i>	6	228-246
<i>mCrCIR03D12a</i>	6	238-270
<i>mCrCIR03G05</i>	7	200-232
<i>mCrCIR02G12</i>	5	228-250
<i>MEST121</i>	4	176-184
<i>MEST431</i>	5	330-348
<i>MEST458</i>	5	208-234
<i>mCrCIR01C06</i>	8	132-170
<i>mCrCIR01C07</i>	5	241-280
<i>mCrCIR01D06a</i>	6	232-244
<i>mCrCIR01E02</i>	7	153-169
<i>mCrCIR01F04a</i>	6	170-210
<i>mCrCIR01F08a</i>	5	118-136
<i>mCrCIR01H05</i>	7	100-136
<i>mCrCIR06B05</i>	3	184-200
<i>mCrCIR07D06</i>	6	163-195
<i>mCrCIR07D07</i>	6	203-223
<i>Total</i>	120	100-348

Les fréquences alléliques par locus pour chaque groupe variétal, ainsi que les paramètres de polymorphisme pour les 20 loci SSRs analysés sont présentés dans la partie Annexes (Annexe II). Le calcul des paramètres génétiques montre des profils similaires pour la plupart des marqueurs (tableau 10) avec de très fortes valeurs d'hétérozygotie ($0.09 < H_0 < 0.99$), un F_{IS} fortement négatif (entre -0.97 et -0.50) et un F_{IT} négatif (-0.47 à -0.06). Les F_{ST} calculés entre les quatre groupes variétaux échantillonnés (bigaradier, oranger, citronnier et limettier) varient entre 0.25 et 0.90. Deux marqueurs, mCrCIR01D06a et mCrCIR02D09, présentent un profil particulier caractérisé par une faible hétérozygotie (0.1) et des indices de fixation et de différenciation élevés (F_{IT} de 0.83 et 0.85, F_{ST} de 0.9).

Tableau 10. Diversité génétique du germoplasme Tunisien pour les 20 marqueurs SSRs

Loci	Ho	He	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	G_{ST}
CI06B05	0.891	0.494	-0.97772	-0.47409	0.25465	0.3308
Ci01D06a	0.108	0.233	-0.65618	0.83441	0.90002	0.5862
Ci02D04	0.881	0.554	-0.8808	-0.1373	0.39531	0.4815
MEST458	0.985	0.614	-0.92115	-0.1252	0.41431	0.3283
MEST121	0.911	0.549	-0.95105	-0.19607	0.38696	0.4098
Ci03D12a	0.950	0.584	-0.93294	-0.15543	0.40225	0.3863
Ci02D09	0.098	0.234	-0.50332	0.85037	0.90047	0.6037
MEST431	0.990	0.586	-0.93555	-0.27314	0.34224	0.2652
Ci07D06	0.965	0.615	-0.92422	-0.06658	0.44571	0.4132
Ci02G12	0.965	0.585	-0.93406	-0.19584	0.3817	0.3384
Ci01F08	0.970	0.584	-0.94446	-0.21145	0.37697	0.3223
Ci01F04	0.980	0.618	-0.90447	-0.111	0.41663	0.2676
Ci01C06	0.980	0.649	-0.70726	-0.16087	0.32004	0.2737
Ci03G05	0.975	0.626	-0.89734	-0.06889	0.43664	0.3813
Ci01C07	0.970	0.613	-0.93485	-0.07983	0.4419	0.3833
Ci02A09	0.901	0.609	-0.91967	0.06681	0.51388	0.5260
Ci03C08	0.995	0.615	-0.93121	-0.14039	0.40949	0.3256
Ci01H05	0.921	0.560	-0.9259	-0.19564	0.37918	0.4288
Ci01E02	0.911	0.546	-0.91484	-0.2515	0.34642	0.4026
Ci07D07	0.970	0.608	-0.92454	-0.10925	0.42363	0.3573
Total (estimation multilocus)			-0.90759	-0.06900	0.43961	0.3898
Moyenne	0.866	0.554	-0.8811	-0.0600	0.4444	0.3905
Intervalle de confiance (95%)	+/- 0.115	+/- 0.050	+/- 0.0519	+/- 0.1428	+/- 0.0722	+/- 0.0424

Les valeurs de l'index *Gst* de Nei (estimateur de *Fst*) mesurant la différenciation génétique ont également été calculées pour chaque locus (Nei, 1977), ainsi que sur la totalité des loci (estimateur non biaisé selon Nei & Chesser 1983). Les valeurs obtenues sont élevées et confirment la différenciation considérable entre groupes variétaux. Le logiciel GENETIX a également été utilisé pour estimer les variances sur *Fit*, *Fis* et *Fst* par ré-échantillonnage selon la méthode de Jackknife (Weir, 1990) sur les loci (Annexe III) et sur les groupes variétaux (données non incluses). Toujours en matière de variance, pour chaque locus, le Programme FSTAT a fait sortir les différents composants de la variance entre échantillons, entre individus au sein d'un même échantillon et à l'intérieur des individus (Annexes IV).

Ces résultats montrent une forte différenciation entre les groupes variétaux et de faibles niveaux de polymorphisme intra-variétal. Parmi les groupes variétaux la plus faible diversité allélique (Tableau 11) a été observée chez l'oranger avec 1.75 allèles/locus. Deux allèles par locus ont été mis en évidence chez les citronniers, et 3/locus dans les deux groupes restants, les bigaradiers et les limettiers.

Tableau 11. Diversité génétique des quatre groupes variétaux prospectés en Tunisie

	na	Index de diversité clonale G/N	He	Ho
Bigaradiers	3.100	10/169	0.458+/-0.07	0.886+/-0.13
Orangers	1.750	1/12	0.375+/-0.10	0.750+/-0.19
Citronniers	1.900	2/12	0.429+/-0.08	0.850+/-0.16
Limettiers	3.150	3/8	0.504+/-0.09	0.637+/-0.15

na: nombre moyen d'allèle/locus; G: nombre de MLGs; N: nombre total d'accessions prospectées; Ho: Hétérozygotie observée; He: hétérozygotie attendue; intervalle de confiance à 95%

Afin de pouvoir comparer le nombre d'allèles des différents groupes variétaux sans se préoccuper du biais lié à l'effectif de l'échantillon, une estimation de la richesse allélique par locus, par groupe variétal et pour l'ensemble de l'échantillon a été présentée dans l'annexe V. Cet indice se base sur le plus petit nombre d'individus génotypés (8 individus diploïdes dans notre cas) pour un locus et pour un groupe variétal. Ce tableau résume clairement la contribution de la richesse allélique de chaque locus dans chaque échantillon et pour l'ensemble des échantillons. Les résultats obtenus ont montré des valeurs variant de 1 à 5.

A propos de l'hétérozygotie attendue et observée, les valeurs obtenues confirment un niveau d'hétérozygotie élevé et n'ont pas montré de différences significatives entre les 4 groupes variétaux (H_e varie de 0.37 à 0.50 et H_o varie de 0.63 à 0.88).

3-2-2- Diversité génotypique

Les données ont permis d'établir un dendrogramme basé sur les dissimilarités et de dégager les relations génétiques entre les accessions de porte-greffes d'agrumes utilisées en Tunisie. Sur ce dendrogramme, trois grands groupes ont été clairement identifiés (Figure 14).

Le plus grand groupe est celui des bigaradiers avec 169 accessions regroupées dans 94% des cas, suivi du groupe des oranges représenté par 12 accessions (bootstrap=100%), et le groupe des agrumes acides incluant 12 citrons (bootstrap=100%) et 6 limes (bootstrap=100%). Enfin 2 accessions de lime douce qui paraissent plus proches du groupe de citrons que celui des autres limes.

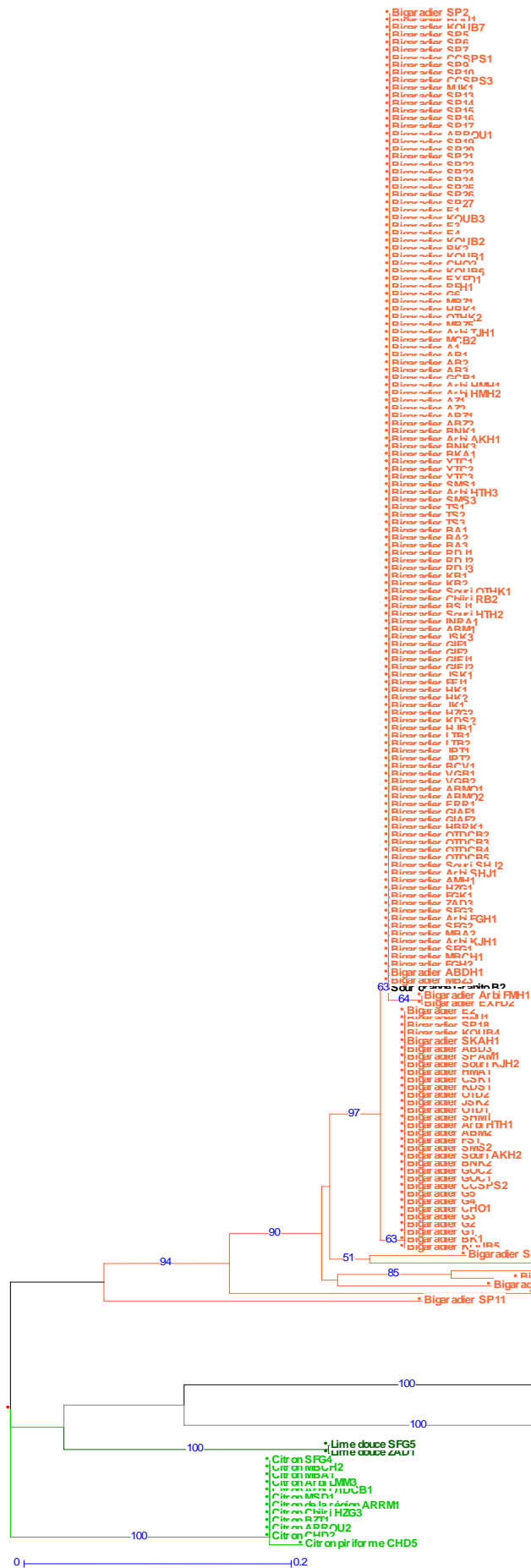


Figure 14. Arbre Neighbor-Joining enraciné illustrant l'organisation de la diversité génétique au sein des 201 accessions utilisées comme porte-greffes des agrumes en Tunisie. Ces accessions ont été analysées avec 20 loci SSRs nucléaires (marquage radioactif). Les valeurs des Bootstrap (1000 ré-échantillonnages) figurent sur les branches si > 50 . Les groupes variétaux ont été colorés comme suit: les bigaradiers en orangé, les orangers en rouge, les citronniers en vert clair et les limes en vert foncé. Le bigaradier Granito en noir a été ajouté à l'analyse pour servir de témoin

En tout 16 MLGs distincts ont été obtenus à partir des 20 loci étudiés (Figure 14), soit un G/N de 0.079. Les index de diversité clonale calculé pour chacun de ces groupes (Tableau 11) varient entre 0.059 pour les bigaradiers et 0.375 pour les limettiers. Le taux de redondance élevé indique qu'une grande partie des accessions étudiées correspondent à des variétés multipliées végétativement (*clones*), en particulier pour le bigaradier. Pour les autres groupes variétaux, le degré d'hétérogénéité au sein de chaque groupe est variable, le groupe des limettiers étant le plus hétérogène (G/N le plus élevé). L'étude des différents MLGs présents dans chacun des groupes formés a montré que les valeurs de dissimilarité faibles correspondent à une variation au niveau d'un allèle sur les 20 marqueurs analysés.

Les 16 MLGs obtenus (Tableau 12) ont été analysés locus par locus.

La majorité des accessions de bigaradier correspondent à deux MLGs, 'bigaradier A' et 'bigaradier B', représentant 128 et 32 accessions, respectivement. Ces deux génotypes diffèrent par un seul allèle au locus *mCrCIR01C06*. Le 'bigaradier C', représenté par 2 accessions, diffère du 'bigaradier A' par son homozygotie à un seul locus (*mCrCIR02G12*).

Cinq des autres MLGs bigaradiers, chacun correspondant à une accession (bigaradier D, E, F, J, H), ont affiché environ la moitié de l'hétérozygotie des MLGs les plus représentés (bigaradiers A et B) sans allèles additionnels (Annexes F.I). Ces cinq accessions se rassemblent avec le groupe le plus important (considéré original) avec une valeur élevée de bootstraps (90%) et sont homozygotes pour 8 à 12 loci. Les deux derniers bigaradiers (MLGs G et I) ont montré des proportions intermédiaires de loci hétérozygotes (78,6% et 65%, respectivement) ainsi qu'un nombre élevé d'allèles "nouveaux" (11 et 12 allèles, respectivement) qui ne sont pas partagés par les autres groupes de bigaradiers A, B et C.

Les quatre limes "*Chiiri*" ont affiché le même génotype pour les 20 loci analysés. Les deux limes douces ont partagé le second MLG des limes, et le troisième MLG a été représenté par le citron *Beldi* et la lime *Arbi* (acide), jusqu'alors considérés potentiellement différents (Figure 14). Ce dernier MLG est proche du génotype des limes "*Chiiri*" (bootstrap=100%).

Onze des 12 citrons se sont montrés identiques, et sont représentés par deux génotypes A et B, le dernier se distinguant en un seul locus (*mCrCIR01F04a*).

Tableau 12. Génotypes uniques, origine et nombre de loci hétérozygotes

N°	N° d'accession (Annexe I)	Nom de l'accession	Code du MLG	Origine	Nombre de loci hétérozygotes /20
1	43	Bigaradier MBZ3	Bigaradier A	Menzel bou Zelfa-Cap-Bon	18
2	190	Bigaradier BMJ1	Bigaradier B	El Mahboubine-Djerba	18
3	158	Bigaradier EXFD2	Bigaradier C	Hammamet	17
4	4	Bigaradier SP4	Bigaradier D	Parc semencier Sbikha- Kairouan	12
5	3	Bigaradier SP3	Bigaradier E	Parc semencier Sbikha- Kairouan	8
6	12	Bigaradier SP12	Bigaradier F	Parc semencier Sbikha- Kairouan	10
7	1	Bigaradier SP1	Bigaradier G	Parc semencier Sbikha- Kairouan	16
8	8	Bigaradier SP8	Bigaradier H	Parc semencier Sbikha- Kairouan	11
9	11	Bigaradier SP11	Bigaradier I	Parc semencier Sbikha- Kairouan	14
10	46	Bigaradier MCB1	Bigaradier J	Menzel bou Zelfa-Cap-Bon	10
11	117	Orange Meski LMM2	Orange Meski LMM2/ Orange 'Douce'	Menzel bou Zelfa-Cap-Bon	15
12	111	Citron Arbi OTDCB1	Citron A	Menzel bou Zelfa-Cap-Bon	17
13	133	Citron piriforme CHD5	Citron B	Degache- Tozeur	17
14	129	Lime Chiiri CHD1	Lime Chiiri CHD1/ Lime 'Chiiri'	Degache- Tozeur	10
15	179	Lime Arbi MMT1	Lime Arbi MMT1/ Lime 'Arbi'	Oasis ancien-Tozeur	16
16	131	Citron Beldi CHD3	Citron Beldi CHD3/ Citron 'Beldi'	Degache- Tozeur	16
17	180	Lime douce ZAD1	Lime douce ZAD1/ Lime 'Douce'	Degache- Tozeur	15

Nous avons choisi de représenter aussi bien le citron Beldi131 et la lime Arbi179 bien qu'ils soient identiques.

3-3- Comparaison du germoplasme local avec les accessions de référence

3-3-1- Marqueurs nucléaires

Afin d'évaluer les relations génétiques des accessions tunisiennes avec les génotypes de référence des mêmes groupes variétaux, les 16 MLGs tunisiens et 23 cultivars d'agrumes de référence ont été analysés ensemble par électrophorèse capillaire, en ayant appliqué les mêmes 20 marqueurs SSRs. Les résultats ont été vérifiés en double lecture et examinés pour détecter les différences ou décalages avec les profils observés au moyen d'amorces radioactives. En cas de doute, les analyses des marqueurs ont été refaites (pour un marqueur). Au final aucune disparité n'a été détectée entre les scores des génotypes Tunisiens étudiés initialement sur gels d'acrylamide, et ceux des génotypes révélés par la suite par électrophorèse capillaire. Le nombre d'allèles par locus et la taille des fragments amplifiés pour chaque marqueur microsatellite analysé sur ces 39 accessions ont été présentés dans le Tableau 13.

Une matrice des dissimilarités génétiques calculées à partir des données alléliques selon le coefficient de *simple matching* a été utilisée pour construire un arbre *Neighbor-Joining* (Figure 15). Quand on considère les deux jeux de résultats obtenus à partir des MLGs Tunisiens seuls ou avec des références (Tableaux 13), on remarque que le nombre d'allèles pour les 20 loci SSRs analysés a augmenté de 120 pour le germoplasme Tunisien (6 allèles/locus) à 162 (8 allèles/locus). Le nombre d'allèles à chaque locus dans chaque groupe variétal et pour l'ensemble des échantillons est détaillé dans l'annexe VI.

De point de vue diversité allélique, tous les 120 allèles rencontrés dans le germoplasme Tunisien ont été retrouvés au niveau du set de référence. Cependant, en matière de diversité génotypique, 11 des 16 génotypes locaux n'ont pas été représentés par le set de référence adopté (Figure 15).

Tableau 13. Nombre d'allèles par locus et taille des fragments amplifiés pour chaque marqueur microsatellite analysé sur le germoplasme local et les accessions de référence

Nom du locus	Nombre d'allèles par locus pour le germoplasme tunisien (marquage radioactif)	Nombre d'allèles par locus pour les MLGs tunisiens et les accessions de référence (électrophorèse capillaire)	Taille des fragments amplifiés (électrophorèse capillaire)
<i>mCrCIR02A09</i>	9	8	151-177
<i>mCrCIR03C08</i>	10	12	197-241
<i>mCrCIR02D04B</i>	4	9	189-236
<i>mCrCIR02D09</i>	6	9	226-248
<i>mCrCIR03D12a</i>	6	9	241-284
<i>mCrCIR03G05</i>	7	9	199-228
<i>mCrCIR02G12</i>	5	7	226-256
<i>MEST121</i>	4	5	176-187
<i>MEST431</i>	5	8	331-354
<i>MEST458</i>	5	10	205-232
<i>mCrCIR01C06</i>	8	9	131-169
<i>mCrCIR01C07</i>	5	8	260-298
<i>mCrCIR01D06a</i>	6	9	244-274
<i>mCrCIR01E02</i>	7	7	172-188
<i>mCrCIR01F04a</i>	6	11	184-230
<i>mCrCIR01F08a</i>	5	5	136-156
<i>mCrCIR01H05</i>	7	8	90-136
<i>mCrCIR06B05</i>	3	3	187-204
<i>mCrCIR07D06</i>	6	8	164-196
<i>mCrCIR07D07</i>	6	8	220-240
<i>Total</i>	120	162	90-354

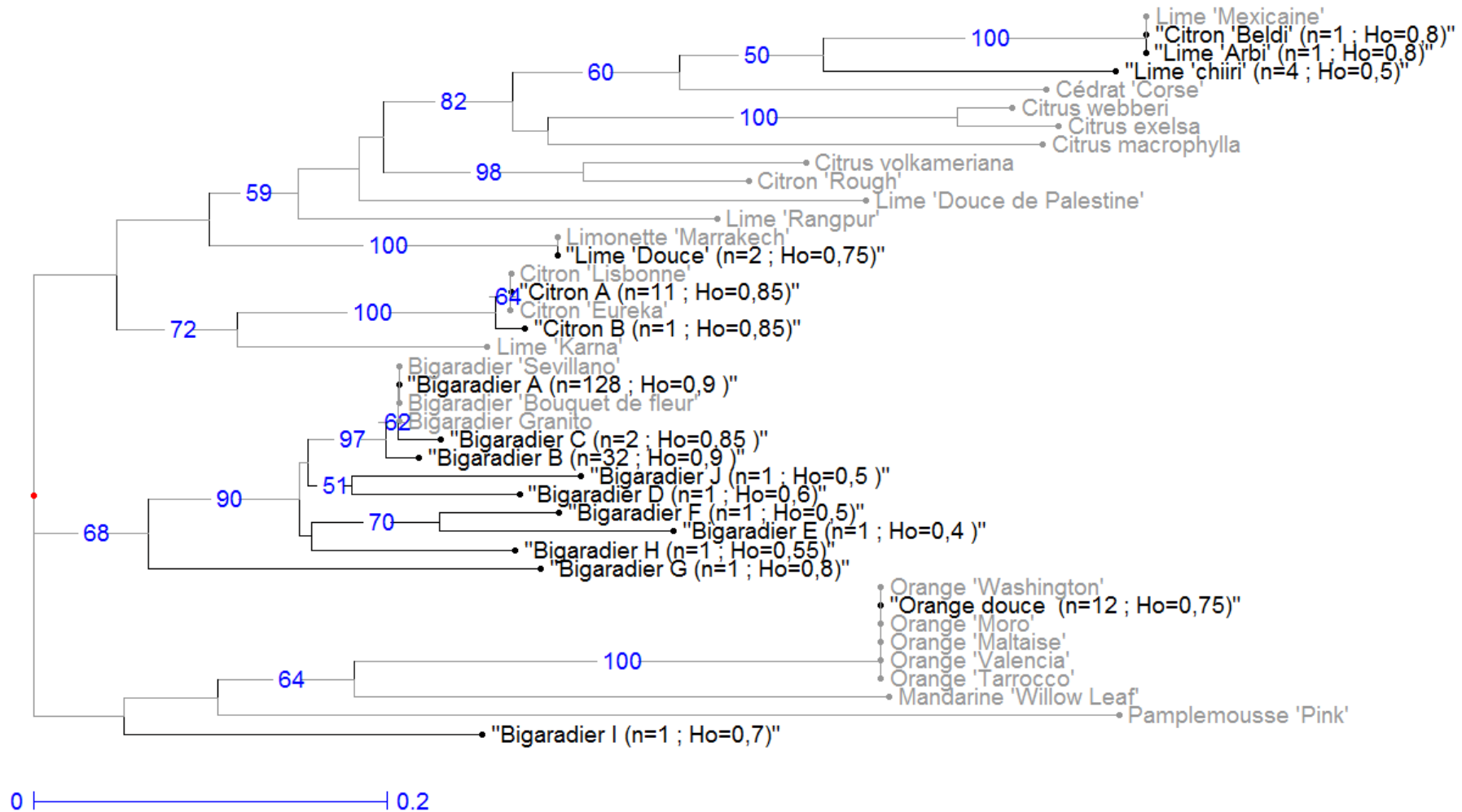


Figure 15. Arbre Neighbor-Joining illustrant les relations génétiques entre les MLGs Tunisiens (16) et les accessions de référence (23), analysés avec 20 loci SSRs nucléaires. Les valeurs des Bootstrap (1000 ré-échantillonnages) figurent sur les branches si > 50. Les noms des MLGs Tunisiens sont colorés en noir et ceux des accessions de référence en gris. n: nombre d'accessions partageant le MLG; Ho: hétérozygotie observée. Les détails relatifs aux codes des MLGs peuvent être revus au tableau 12. La liste des variétés d'agrumes de référence représentant les différents taxons est détaillée au tableau 6.

3-3-2- Marqueurs mitochondriaux

Les 39 accessions analysées avec les marqueurs SSRs ont aussi été génotypées avec quatre marqueurs mitochondriaux: *rrn5/rrn18-1*, *nad2/4-3*, *nad5/2-1* et *nad7/1-2*. Ces marqueurs ont permis une différenciation claire entre les quatre taxons de base des agrumes cultivés. Au total, cinq mitotypes ont été observés (Figure 16). Le plus représentatif inclut tous les oranges douces, bigarades et citrons, avec le pamplemousse 'Pink', la lime 'Karna', la lime 'Douce de Palestine', la 'limonette de Marrakech' et la lime 'Douce' de Tunisie. Un second mitotype a associé les deux génotypes Tunisiens représentant le couple citron '*Beldi*'/ lime '*Arbi*' et la lime '*Chiiri*', avec la lime 'Mexicaine', *C. webberi*, *C. macrophylla* et *C. exelsa*. La lime 'Rangpur', le citron 'Rough' et le citron 'Volkamer' ont formé le troisième groupe. La mandarine 'Willow leaf' ainsi que le cédrat de Corse constituaient les deux derniers mitotypes.

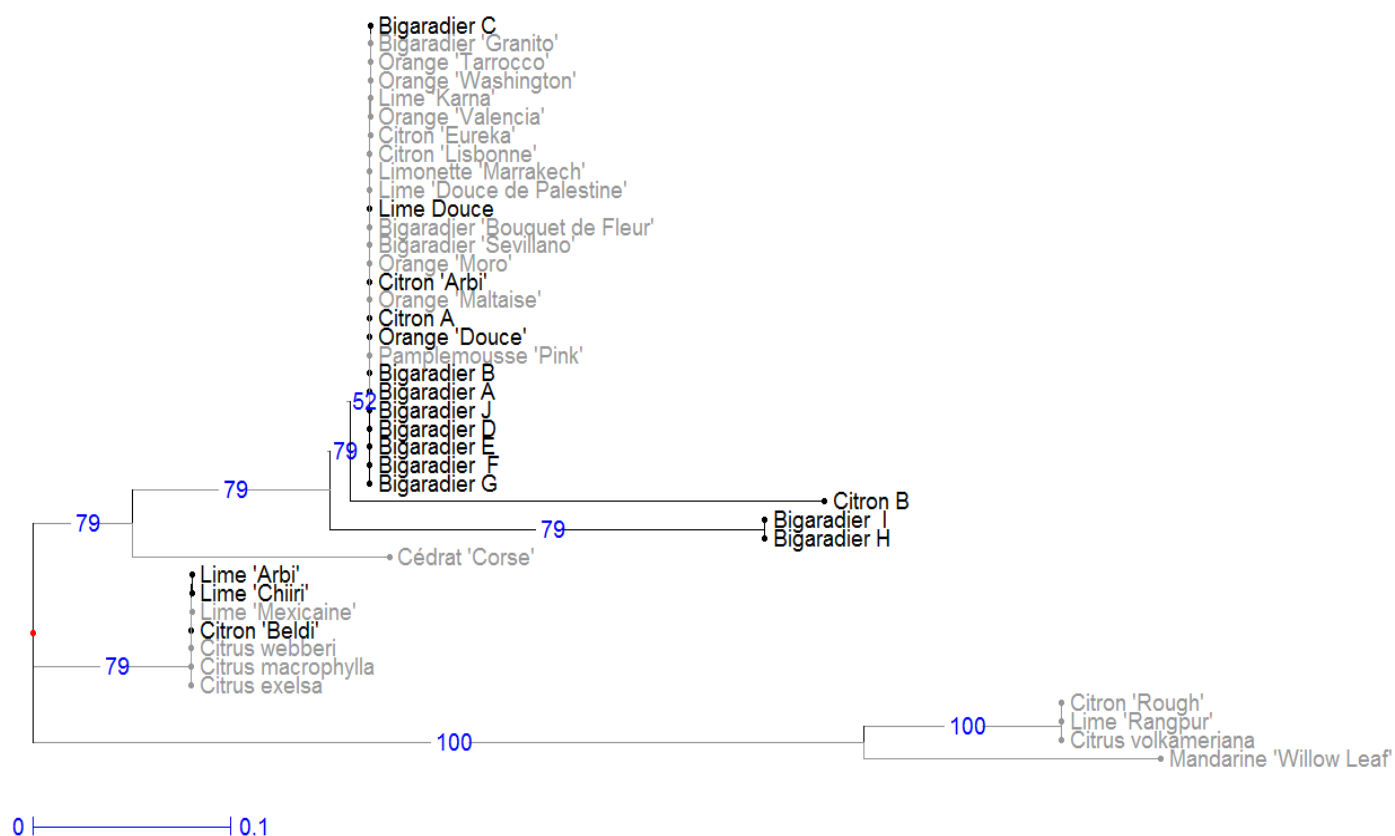


Figure 16. Relations maternelles entre les génotypes Tunisiens et les accessions de référence analysés avec les 4 marqueurs indel mitochondriaux (arbre NJ). Les valeurs des Bootstrap (1000 ré-échantillonnages) figurent sur les branches si > 50. Les noms des MLGs Tunisiens sont colorés en noir et ceux des accessions de référence en gris. Les détails relatifs aux codes des MLGs peuvent être revus au tableau 12. La liste des variétés d'agrumes de référence représentant les différents taxons est détaillée au tableau 6.

IV- Discussion

La structuration interspécifique constitue un élément majeur de la variabilité du germoplasme Tunisien

Les paramètres génétiques et l'analyse des dissimilarités, ont indiqué une forte structuration génétique du germoplasme Tunisien d'agrumes, qui a aussi été caractérisé par un excès significatif d'hétérozygotie, aussi bien pour l'échantillon entier que pour chaque groupe variétal (bigarade, orange douce, lime et citron). Ces résultats confirment la différenciation importante entre les quatre groupes variétaux analysés et la limitation du flux de gènes entre ces groupes.

Le jeu de 20 marqueurs SSRs utilisé dans cette étude a été suffisant pour obtenir des agrégations génétiques, permettant l'identification claire des groupes variétaux d'agrumes et la production de résultats cohérents avec les études antérieures (Herrero *et al.*, 1996b; Asins *et al.*, 1997; Federici *et al.*, 1998; Nicolosi *et al.*, 2000; Luro *et al.*, 2001; Moore, 2001; Ahmad *et al.*, 2003; Bernet *et al.*, 2004; Barkley *et al.*, 2006; Nicolosi, 2007).

Le groupement des MLGs Tunisiens parmi une diversité plus large de la collection de référence, a confirmé l'importance de la différenciation interspécifique comme élément majeur de la variabilité du germoplasme Tunisien. En effet, l'analyse de la diversité par microsatellites nucléaires a séparé les accessions Tunisiennes en trois groupes (Figure 15).

Le premier rassemble la plupart des MLGs de bigaradiers Tunisiens avec les accessions de référence de la région méditerranéenne : 'Granito', 'Bouquet de fleur' et 'Sevillano', représentées par un génotype unique partagé avec le génotype 'bigaradier A' tunisien qui regroupe la majorité des accessions de bigaradiers collectées (128 accessions).

Toutes les accessions d'orange douce, incluant les MLGs Tunisiens et les références ('Moro', 'Washington', 'Maltaise', 'Valencia', 'Tarrocco') sont identiques et forment le second groupe, avec le mandarinier 'Willow leaf' et le pamplemousse 'Pink'. Cette association est en concordance avec l'origine des oranges douces supposées dériver, tout comme la bigarade, d'hybridations entre les pools géniques des mandarines et des pamplemousses.

L'analyse du génome mitochondrial (ADNmt) transmis par la mère a montré que les accessions d'orange et de bigarade partagent le mitotype du pamplemousse (Figure 16). Ceci conforte l'hypothèse que le pamplemousse est le parent femelle des oranges et des bigarades

proposée par Nicolosi *et al.*, (2000, 2007) à la suite d'études sur l'ADN chloroplastique, et soutenue par Froelicher *et al.* (2011) à partir de résultats d'étude de l'ADN mitochondrial.

Le troisième groupe rassemble les limes et les citrons avec le cédrat et les autres espèces d'agrumes acides. Tous les limes et citrons Tunisiens se sont montrés identiques à des génotypes de référence provenant des collections française et espagnole, à l'exception de la lime '*Chiiri*' et du citron MLG B (Figure 15). L'hypothèse actuellement acceptée est que citron et lime sont le résultat de diversification secondaire par hybridation interspécifique impliquant le cédrat comme l'un des parents (Nicolosi *et al.*, 2000; Barkley *et al.*, 2006). Nicolosi *et al.* (2000) ainsi que Gulsen et Roose (2001 a,b) ont avancé d'après des données moléculaires, que le citron est le résultat d'hybridation entre bigarade et cédrat. Les résultats de cette étude montrent que la bigarade partage le mitotype des citrons analysés, ce qui confirme l'hypothèse que la bigarade est le parent maternel du citron (Nicolosi *et al.*, 2000; Froelicher *et al.*, 2011). Les cultivars de lime ont des origines multiples et complexes et seront présentées lors de l'analyse de la diversité intraspécifique des agrumes en Tunisie.

Toutes les espèces d'agrumes sont sexuellement compatibles (Barrett, 1977; Iwamasa *et al.*, 1988). Toutefois, les méthodes de propagation horticoles végétatives (marcottage) et l'apomixie facultative sont des freins au brassage génétique.

En Tunisie, les introductions de matériel végétal (à partir de différentes espèces secondaires fortement hétérozygotes) ont été multiples. La forte structuration subsistant dans les zones où les taxons sont en contact, et l'excès important d'hétérozygotie dans ces taxons, attestent en faveur d'une très forte limitation de la reproduction sexuée des taxons apomictiques facultatifs étudiés.

Diversité intraspécifique du germoplasme Tunisien

L'hétérozygotie observée au sein de chaque groupe variétal est très élevée (Tableau 11). Au sein de chaque espèce, cette hétérozygotie est associée à une faible différenciation inter-cultivars (faibles MLG/ratios d'accessions et fortes valeurs négatives de Fis) (Annexe VII). Ces résultats sont en accord avec l'origine interspécifique généralement acceptée de ces groupes variétaux (Barrett et Rhodes, 1976; Federici *et al.*, 1998; Nicolosi *et al.*, 2000; Ollitrault *et al.*, 2003; Barkley *et al.*, 2006; Ollitrault *et al.*, 2010) et le rôle prédominant des mutations ou des variations épigénétiques dans leur différenciation interspécifique (Herrero *et al.*, 1996a; Ollitrault *et al.*, 2003).

Bigaradiers:

L'analyse génotypique des 169 accessions collectées avec 20 marqueurs microsatellites, a révélé 10 génotypes uniques avec d'importantes redondances ($G/N = 0.059$). Ces redondances étaient prévisibles, étant donné que les variétés de porte-greffes standards multipliées végétativement sont distribuées dans tout le pays. De plus, le bigaradier étant le porte-greffe le plus répandu en Tunisie fait l'objet d'échanges entre les zones de production agrumicole (Cap-Bon, principale région de production agrumicole) et le reste du pays. Ainsi, 162 accessions correspondaient à trois MLGs (A, B et C) fortement hétérozygotes et très proches les uns des autres, différant seulement par un seul allèle. Le MLG A, le plus représenté (128 accessions), est identique aux trois génotypes de référence originaires des autres pays du bassin méditerranéen (Maroc, Espagne et Corse). Au sein de ce groupe, plusieurs accessions collectées sont nommées en référence à des caractères morphologiques particuliers. Par exemple, les accessions bigarade ou 'Aranj', 'Chiiri', 'Aranj avec fruits aplatis', 'Aranj doux', 'Aranj à feuilles très longues et filiformes', 'Aranj avec de très petites feuilles et fruits', 'Aranj Arbi' et 'Aranj Souris', partagent le même MLG A. Cela suggère que les variants phénotypiques observés entre ces trois MLGs (A, B et C) et au sein de ceux-ci, pourraient être des mutants somatiques issus d'un même bigaradier ancestral au cours des cycles de propagation végétative.

Les sept autres MLGs de bigaradier (D, E, F, G, H, I et J) correspondaient à des accessions uniques, certaines d'entre elles étant utilisées comme arbre-mère pour l'approvisionnement en semences (D, E, F, G, H). Toutes partageaient le même mitotype que les bigarades de référence. Cinq de ces MLGs (D, E, F, J, H) ont montré une hétérozygotie relativement réduite comparés avec la bigarade de référence, aussi bien qu'une absence d'allèles additionnels en comparaison avec les trois MLGs prédominants (A, B et C). Ceci nous amène à émettre l'hypothèse que ces MLGs sont des plants zygotiques résultant d'autofécondation au sein des groupes prédominants. Seule une de ces accessions, le 'bigaradier J', est associé à un phénotype original et connu comme 'bigaradier à feuilles de saule'.

La comparaison des deux MLGs de bigaradiers G et I avec les génotypes 'originaux' A, B et C met en évidence des allèles différents (Tableau 14). Le bigaradier MLG G a présenté 14 loci qui différaient de ceux observés chez les génotypes de référence. Dans ces loci, onze allèles étaient introuvables chez les accessions de référence bigaradier. Dix de ces allèles (91%) ont été identifiés comme partagés avec la mandarine 'Willow leaf'. De la même façon, le

bigaradier MLG I a montré 17 loci différents de ceux chez les génotypes de référence, comportant 12 allèles qu'on retrouve chez une référence de l'orange.

Cette analyse indique que les bigaradiers G et I pourraient résulter d'hybridations interspécifiques entre bigaradier et un représentant du groupe mandarine (G) et entre bigarade et orange (I). Ces hypothèses sont confortées par leur positionnement dans les représentations de la diversité (Figure 15).

Ces résultats sont en concordance avec l'hypothèse couramment admise d'une origine hybride de l'espèce *C. aurantium*, composée principalement du génotype *C. reticulata* introgressé avec les gènes provenant de *C. maxima*, (Barrett et Rhodes, 1976; Nicolosi *et al.*, 2000; Moore, 2001; Asadi Abkenar *et al.*, 2004; Nicolosi, 2007). Un bigaradier 'ancestral' issu de cet événement d'hybridation se serait diversifié par mutation somatique (A, B, C), ou par la voie de la reproduction sexuée autogame (D, E, F, G, H) ou allogame (I, J). Ces événements auraient pu avoir lieu avant ou après introduction en Tunisie.

En ce qui concerne les bigaradiers d'origine zygotique, six des sept MLGs ont été collectés à Sbikha (Kairouan), dans un verger d'arbres-mères pour la propagation par graines. Tous les arbres de bigaradier de ce verger ont été introduits sous forme de graines. Les 22 autres plants analysés à partir de ce verger étaient génétiquement identiques au MLG A. Ainsi, un taux de 21.4% de plants zygotiques a pu être estimé dans cette population. L'apomixie facultative chez les agrumes relève de la polyembryonie nucellaire adventive dans des graines contenant aussi un embryon zygotique. La fréquence des plants apomictiques parmi tous les plants issus de semis est déterminée par la compétition entre les embryons nucellaires et l'embryon zygotique durant le développement et la germination de la graine (Kepiro et Roose, 2007). Les fréquences des plants zygotiques chez un plant de porte-greffe dépend aussi du génotype et de l'environnement (Khan et Roose, 1988; Kepiro et Roose, 2007). Frost et Soost (1968) ont signalé un taux de 15% de plants zygotiques chez les bigaradiers, alors que pour Moore et Castle (1988) ce taux était nul. Nos résultats mettent en évidence le potentiel biologique de la diversification par la recombinaison sexuée, même chez des plantes à reproduction apomictique prédominante. Cependant, parmi toutes les accessions incluses dans notre analyse, seuls ces plants zygotiques ont été observés comme accessions uniques et ce dans un contexte bien spécifique. Ces résultats laissent supposer que les pépiniéristes ainsi que les cultivateurs ont exercé une sélection efficace et contre-sélectionnent de tels hors-types zygotiques par observation visuelle.

Tableau 14. Les différents loci et allèles différenciant les accessions locales des génotypes de référence

			Loci différents du MLG de référence correspondant					
Génotypes	N	Hom	MLG de référence Considéré	NL	HomD	NA	Autres MLGs de référence partageant ces allèles*	Origine potentielle
Bigaradier A (id réf)	128	10%	Bigaradier Sevillano (IVIA-117)					
Bigaradier B	32	10%		1	0%	1	aucun	Mutation
Bigaradier C	2	15%		1	100%	0		Mutation
Bigaradier D	1	40%		6	100%	0		Autofécondation
Bigaradier E	1	60%		10	100%	0		Autofécondation
Bigaradier F	1	50%		8	100%	0		Autofécondation
Bigaradier J	1	50%		8	100%	0		Autofécondation
Bigaradier H	1	45%		7	100%	0		Autofécondation
Bigaradier G	1	20%		14	21%	11	mandarine (10), lime Rangpur (4), Orange (3), Citron Rough (4)...	hybridation avec mandarine
Bigaradier I	1	30%		17	35%	12	Orange (12), mandarine (5), pamplemousse (3)...	hybridation avec orange
Citron A (id ref)	11	15%	Citron Eureka (IVIA-297)					
Citron B	1	15%		1	0%	1	Orange (1), lime douce (1), mandarine (1)	Mutation
Lime Chiiri	4	50%	Lime Mexicaine (IVIA-164)	14	50%	9	Cédrat (8), citron (6)	hybridation avec cédrat

N: Nombre d'accessions; Hom: % de loci homozygotes; NL: nombre de loci; HomD: % de loci homozygotes parmi ceux différenciés de la référence; NA: nombre d'allèles introuvables chez la référence des MLGs; * le nombre d'allèles partagés est indiqué entre parenthèses.

Oranges:

Les accessions d'orange collectées en Tunisie, bien qu'identifiées par des caractères phénotypiques du fruit (doux, acide, de couleur rouge) ou différenciées pour leur résistance à la salinité (cv *Meski*), étaient identiques pour tous les marqueurs analysés et très hétérozygotes. En outre, les accessions d'orange douce ont aussi montré le même profil moléculaire que les cinq cultivars de référence de la collection d'IVIA. Cette base génétique étroite des accessions d'orange a été reconnue dans des études antérieures (Herrero *et al.*, 1996a; Fang et Roose, 1997; Targon *et al.*, 2000; Luro *et al.*, 2001; Novelli *et al.*, 2006). Comme pour le bigaradier, la plupart des auteurs pensent que l'orange douce a une origine interspécifique (entre patrimoines génétiques du pamplemousse et de la mandarine), et la diversité inter-variétale au sein de cette espèce est attribuée aux mutations somatiques (Herrero *et al.*, 1996a; Ollitrault *et al.*, 2003; Barkley *et al.*, 2006; Nicolosi, 2007). Ces

mutations pourraient modifier certains caractères horticoles, essentiellement liés au fruit (Hodgson, 1967). C'est ainsi qu'elles ont été sélectionnées par les cultivateurs.

Citrons:

Les citrons se sont révélés fortement hétérozygotes pour la grande majorité des loci SSRs analysés (17/20). Les accessions Tunisiennes ont révélé deux MLGs. Le MLG le plus représenté (A) était identique aux accessions de référence des citrons 'Eureka' et 'Lisbonne', tandis que le second MLG (B) caractérisé par un fruit piriforme à apex mammiforme bien marqué, a montré un seul allèle SSR différent. Ce dernier type résulterait vraisemblablement d'une mutation du citron de référence.

Limes:

Trois MLGs différents ont été identifiés pour les limes collectées en Tunisie pour cette étude. Bien que facilement identifiées par les agriculteurs grâce à leurs différences phénotypiques, les limes 'Arbi' et 'Beldi' ont présenté le même génotype que l'accession de référence 'lime Mexicaine', dont ils pourraient être des variants phénotypiques. Ces deux limes Tunisiennes font donc partie de *C. aurantifolia* Swing. (classification de Tanaka).

Les accessions de lime douce ne diffèrent pas de la lime du Maroc 'limonette de Marrakech', elles sont classées dans *C. limetta* Risso (classification de Tanaka). La relation phénotypique très étroite entre limes douces Tunisiennes et la 'limonette de Marrakech' a été mentionnée par Hodgson (1967). Pour cet auteur, la seule différence était le goût non acide de la pulpe dans la lime Tunisienne pendant que l'acidité est omniprésente chez la 'limonette de Marrakech'.

A partir de nos résultats, il est très probable que la lime douce Tunisienne soit un mutant non acide d'une forme acide telle que 'limonette de Marrakech' comme proposé par Hodgson.

Le MLG 'lime Chiiri' n'a pas été observé parmi les génotypes de référence. Dans la représentation de la diversité par NJ (Figure 15) il se regroupe avec le génotype 'lime Mexicaine' et est proche du cédrat. Son niveau d'hétérozygotie est faible en comparaison aux autres groupes d'agrumes étudiés (Tableau 12). La comparaison locus par locus avec la lime 'Mexicaine' a révélé une forte proportion de loci homozygotes (50% contre 20%) et neuf allèles différents, dont huit ont été retrouvés chez la référence cédrat (Tableau 14).

Nous faisons l'hypothèse que la lime Tunisienne 'Chiiri' résulte d'un croisement entre la lime 'Mexicaine' ou un de ses 'mutants' et le cédrat. Une étude récente basée sur les marqueurs mitochondriaux (Froelicher *et al.*, 2011) a suggéré que les limes avaient trois origines

maternelles différentes: le mitotype *C. maxima* est partagé avec la 'limonette de Marrakech' et la 'lime douce de Palestine', le mitotype *C. micrantha* (espèce papada qui produit des fruits non comestibles), est partagé avec la lime 'Mexicaine', et le mitotype mandarine acide (*C. reshni*) est partagé avec la lime 'Rangpur'. Dans notre analyse, les données mitochondriales ont bien confirmé les identités trouvées à l'échelle nucléaire entre 'limonette de Marrakech' et limes douces Tunisiennes, ainsi qu'entre la lime 'Mexicaine', le citron 'Beldi' et la lime 'Arbi'. La lime 'Chiiri' partage le cytoplasme de la lime 'mexicaine', qui pourrait donc être son parent maternel. Notre échantillon de génotypes de référence étant relativement limité, il n'est pas possible de savoir si la lime 'Chiiri' est un hybride originaire de la Tunisie ou a été introduite à partir d'autres pays.

L'analyse du germoplasme Tunisien en utilisant les microsatellites a confirmé que la diversification des quatre espèces d'agrumes apomictiques était le résultat de trois processus: (1) les introductions multiples à partir de matériel diversifié, (2) la mutation du matériel local, et (3) la recombinaison sexuée. La contribution de chacun de ces processus varie en fonction de l'espèce considérée. Pour les oranges et les citrons qui présentent un niveau d'hétérozygotie très élevé et pas ou très peu de diversité génétique intraspécifique, il n'y aurait donc pas d'intervention de la recombinaison sexuée et la faible diversification existante pourrait être attribuée à la sélection de mutations somaclonales d'intérêt. Chez les bigaradiers la recombinaison sexuée serait à l'origine de sept accessions parmi 169 analysées, soit 4%. Pour les limes, l'identification de deux MLGs Tunisiens avec les références d'autres pays milite en faveur d'au moins deux introductions. La lime 'Chiiri' a potentiellement résulté d'événements sexuels survenus en Tunisie. Toutefois, il n'est pas possible, sans retracer l'origine de la plante, de distinguer entre introductions multiples de matériels prédifférenciés et variation *de novo*, en Tunisie.

Nos résultats ont montré que, bien que la reproduction sexuée soit rare dans les espèces d'agrumes apomictiques, la descendance issue d'autofécondation ou de croisements interspécifiques peut être sélectionnée par les agriculteurs.

Cependant, une grande partie des variations observées apparaît d'origine non sexuée et peut être attribuée aux mutations ou aux variations somaclonales. Ceci est en accord avec plusieurs études qui démontrent que les mutations ou variations épigénétiques expliquent une part significative de la variation au sein des espèces apomictiques et constituent le facteur principal de leur diversification (Hörandl et Paun, 2007; Nybom, 2007). La contribution des

mutations somatiques à l'évolution des autres cultures à propagation végétative, telles que la vigne (Crespan, 2004), l'olivier (Cipriani *et al.*, 2002), l'igname (Scarcelli, 2005) et le manioc (Sardos *et al.*, 2008), a par ailleurs été démontrée. La sélection humaine de nouveaux phénotypes suivie de multiplication clonale constitue un facteur de diversification important expliquant le polymorphisme morphologique intervariétal relativement élevé des espèces à multiplication végétative (Barrett et Rhodes, 1976; Ollitrault *et al.*, 2003).

Chapitre II

Étude de la diversité allélique des gènes candidats de tolérance à la salinité- structuration au sein du genre *Citrus* et diversité du germoplasme tunisien

Il y a toujours quelques individus que le hasard isole, ou que la génétique favorise.

Ronald Wright

I- Introduction

Avec le développement de la génomique, les études se sont concentrées sur les bases moléculaires de l'adaptation. De nombreux groupes de recherche se sont interrogé sur la nature, le nombre et la localisation de gènes ou mutations impliqués dans l'adaptation (Barton et Keightley, 2002), ainsi que la distribution et l'amplitude des effets alléliques sur les phénotypes (Wright et Gaut, 2005). En 2005, aucun marqueur moléculaire n'était identifié pour la tolérance des agrumes aux stress abiotiques. Il est connu que chez les agrumes, la plupart des marqueurs physiologiques liés à la tolérance à la salinité sont associés à l'accumulation du chlorure dans les feuilles plutôt qu'à celle du sodium (Romero-Aranda *et al.*, 1998). Par conséquent, la capacité des agrumes à tolérer la salinité est intimement liée à la capacité du porte-greffe à exclure le chlorure. À l'échelle moléculaire, les mécanismes impliqués dans la compartimentation de Na^+ sont bien documentés et plusieurs gènes codant pour des co-transporteurs Na^+ et des régulateurs (ex. *Nhx1*, *Sos1*, *Sos2* et *Sos3*) ont été caractérisés (Apse *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2004). *Sos1* est un déterminant essentiel de la tolérance à la salinité chez les plantes (Shi *et al.*, 2002; Olías *et al.*, 2009; Quintero *et al.*, 2011), tout en protégeant les cellules individuelles de la toxicité due au sodium (Zhu et Wu, 2008; Fraile-Escanciano *et al.*, 2010). Toutefois, très peu est connu sur les mécanismes impliqués dans l'acquisition et le transport de Cl^- , ainsi que sur les réponses des gènes à l'excès du chlorure (Storey and Walker, 1999). En se basant sur des études physiologiques, il est prédit que l'accumulation du chlorure chez les agrumes, régulera les gènes impliqués dans les transporteurs membranaires de Cl^- (Moya *et al.*, 2002; Roberts, 2006; Tadeo *et al.*, 2008). En effet, l'implication directe de transporteurs potentiels Cl^- à la tolérance au sel a été analysée à travers l'identification de gènes codant pour des transporteurs membranaires qui sont réceptifs à la toxicité en Cl^- . Plusieurs gènes identifiés s'expriment différemment non seulement par rapport au stress salin mais aussi en comparant l'expression des génotypes tolérants et sensibles. Colmenero-Flores *et al.* (2007) a identifié les premiers gènes candidats pour la régulation du transport des chlorures, la famille des co-transporteurs cation- Cl^- (*Ccc*). Un autre gène, *Nrt1-2* (Contig3169), codant pour un membre de la famille des transporteurs d'oligopeptides proton-dépendant (POT), est potentiellement impliqué dans l'homéostasie du chlorure. Le gène homologue à *Nrt1-2* chez les *Citrus* est sans doute impliqué dans l'assimilation cellulaire de Cl^- à travers une activité symport H^+/Cl^- (Brumós *et al.*, 2009). Les microarrays ont été choisis pour étudier l'expression de milliers de gènes et identifier parmi toutes les séquences,

les meilleurs gènes candidats et marqueurs moléculaires pour la tolérance à la salinité (Projet INCO CIBEWU).

Des études récentes sur la diversité allélique des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des caroténoïdes (Fanciullino *et al.*, 2006, 2007), des métabolites et gènes putatifs pour la tolérance à la salinité (Garcia-Lor *et al.*, 2013) ont montré que cette diversité allélique est directement liée à l'histoire évolutive des génotypes étudiés d'origine interspécifique, et que la plupart de la diversité des gènes se situe entre les trois taxons ancestraux de base (pamplemousse –*C. maxima*-, cédrat –*C. medica*- et mandarine –*C. reticulata*-).

Dans ce chapitre, on cherche des polymorphismes SNPs chez 54 accessions d'agrumes qui représentent le genre *Citrus* incluant les taxons ancestraux (*C. maxima*, *C. medica*, *C. reticulata* et *C. micrantha*) et les quatre espèces secondaires qui en découlent (*C. aurantium*, *Citrus sinensis*, *Citrus limon*, *Citrus paradisi*, *Citrus aurantifolia*). Il s'agit de séquencer les fragments d'ADN amplifiés à partir de 6 gènes putatifs de tolérance à la salinité. En plus de la découverte de marqueurs SNPs intra et interspécifiques, cette étude se propose d'apporter des éléments de réponse aux questions suivantes : (i) quelles sont les relations phylogénétiques au niveau nucléaire entre les différentes espèces du genre *Citrus*?; ii) quel était le degré de diversité intra et interspécifique entre les taxons du genre *Citrus* à l'origine des formes cultivées?; iii) L'évolution des gènes putatifs à l'adaptation au stress salin suivrait-elle un profil neutre et similaire relativement à l'histoire et à la biologie reproductive des agrumes, ou est ce que certains gènes dévoilent une évolution sélective?; iv) quel est le profil d'héritage phylogénétique des gènes analysés chez les espèces secondaires du genre *Citrus*, et particulièrement chez les porte-greffes tunisiens étudiés?

II- Matériel et Méthodes

2-1- Matériel végétal

Dans un objectif d'identifier des mutations ponctuelles (SNPs) au sein de gènes candidats de tolérance à la salinité entre diverses espèces d'agrumes, en l'occurrence celles utilisées comme porte-greffes, on a sélectionné du matériel végétal tunisien comprenant certains génotypes remarquables de point de vue tolérance à la salinité, ainsi qu'une base de variétés d'agrumes de référence. Pour le matériel végétal tunisien, il s'agit des 16 génotypes uniques identifiés à la suite du premier travail d'analyse de la diversité génétique (marqueurs SSRs) des porte-greffes locaux (Tableau 15) (Snoussi *et al.*, 2012). Les accessions tunisiennes sont issues de la prospection réalisée à travers tout le pays pour collecter du matériel utilisé comme porte-greffe, en insistant sur les zones présentant des problèmes de salinité. Quand aux références, elles consistent en 37 accessions d'agrumes (Tableau 16). Selon le système de classification de Swingle et Reece (1967), 21 génotypes appartiennent aux trois taxons ancestraux ou taxons de base (8 *C. reticulata*, 8 *C. maxima*, 4 *C. medica* et 1 *C. micrantha*), et 16 génotypes représentent les espèces secondaires (1 clémentine diploïde, 3 *C. aurantium*, 1 *Citrus sinensis*, 5 *Citrus limon*, 2 *Citrus paradisi*, 4 *Citrus aurantifolia*). Ces 16 génotypes sont connus pour être des hybrides d'origine interspécifique dérivant des populations ancestrales et constituent des cultivars économiquement importants. Pour raciner l'arbre phylogénétique, une espèce apparentée aux agrumes (*Severinia buxifolia*) a été ajoutée à l'analyse. Il a servi d'OTU, dont on sait qu'il est externe au groupe étudié = *outgroup* (groupe externe). Le choix de ces génotypes de référence a été fondé sur leur représentativité de la diversité globale des agrumes cultivés. Les accessions ont été obtenues à partir de la banque de germoplasme d'agrumes de l'IVIA, ainsi que de la collection de Corse.

Tableau 15. Les génotypes Tunisien issus de l'étude de diversité et faisant l'objet d'analyse de la diversité allélique des gènes candidats pour la tolérance à la salinité

Nom de l'accession	Identifiant	Origine
Sour orange 1	Sour orange G	Sbikha
Sour orange 3	Sour orange E	Sbikha
Sour orange 4	Sour orange D	Sbikha
Sour orange 8	Sour orange H	Sbikha
Sour orange 11	Sour orange I	Sbikha
Sour orange 12	Sour orange F	Sbikha
Sour orange 43	Sour orange A	Menzel Bouzelfa
Sour orange f/1 46	Sour orange J	Menzel Bouzelfa
Sour orange 158	Sour orange C	Hammamet
Sour orange 190	Sour orange B	Jerba
Orange Meski 117	Sweet orange	Menzel Bouzelfa
Lemon Arbi 111	Lemon A	Menzel Bouzelfa
Lemon Beldi 131	Lemon 'Beldi'	Tozeur
Lemon/dugs form 133	Lemon B	Tozeur
Lime chiiri 129	Lime 'chiiri'	Tozeur
Lime Arbi 179	Lime 'Arbi'	Tozeur
Sweet lime 180	Lime 'Sweet'	Tozeur

Tableau 16. Les génotypes utilisés comme références pour l'analyse de la diversité allélique des gènes candidats pour la tolérance à la salinité

Group	Ref.*	Nom scientifique (Swingle)	Nom scientifique (Tanaka)	Cultivar	code
Mandarine	SRA948	<i>C. reticulata</i> var. <i>austera</i>	<i>C. reshni</i> Hort. ex Tan.	Cléopâtre	MSRA948
Mandarine	SRA133	<i>C. reticulata</i> Blanco	<i>C. deliciosa</i> Ten.	Willow leaf	MSRA133
Mandarine	IVIA482	<i>C. reticulata</i> Blanco	<i>C. reticulata</i> Blanco	Ponkan	MIVIA482
Mandarine	ICVN 0110076	<i>C. reticulata</i> var. <i>austera</i>	<i>C. sunki</i> Hort. ex Tan.	Sunki	MICVN076
Mandarine	SRA 847	<i>Hybride C. reticulata</i>	<i>C. depressa</i> Hayata	Shekwasha	MSRA847
Mandarine	SRA 599	<i>C. tachibana</i>	<i>C. erythrosa</i> Hort. ex Tan.	Fuzhu	MSRA599
Mandarine	SRA896	<i>Hybride C. reticulata</i>	<i>C. amblycarpa</i> (Hassk.) ochse	Nasnaran	MSRA896
Mandarine	IVIA238	<i>Hybride C. reticulata</i>	<i>C. depressa</i> Hayata	Hayata	MIVIA238
Pamplemousse	IVIA207	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	Chandler	PIVIA207
Pamplemousse	ICVN0100322	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	Pink	PICVN322
Pamplemousse	IVIA590	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	Nam Roi	PIVIA590
Pamplemousse	SRA727	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	Tahiti	PSRA727
Pamplemousse	SRA673	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	De florès	PSRA673
Pamplemousse	SRA610	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	Eingedi	PSRA610
Pamplemousse	SRA321	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	Kao pan	PSRA321
Pamplemousse	SRA707	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	De Timor	PSRA707
Cédrat	SRA701	<i>C. medica</i> L.	<i>C. medica</i> L.	Poncire commun	CSRA701
Cédrat	IVIA560	<i>C. medica</i> L.	<i>C. medica</i> L.	Diamante	CIVIA560
Cédrat	IVIA202	<i>C. medica</i> L.	<i>C. medica</i> L.	Digité	CIVIA202
Cédrat	IVIA567	<i>C. medica</i> L.	<i>C. medica</i> L.	Corse	CIVIA567
Papeda	IVIA626	<i>C. micrantha</i> Wester	<i>C. micrantha</i> Wester	Petit papeda fleuri	WIVIA626
Clémentine	IVIA22	<i>C. reticulata</i> Blanco	<i>C. clementina</i> Hort. ex Tan.	Clemenules	CIIVIA22
Bigaradier	SRA952	<i>C. aurantium</i> L.	<i>C. aurantium</i> L.	Maroc	BSRA952
Bigaradier	IVIA139	<i>C. aurantium</i> L.	<i>C. aurantium</i> L.	Bouquet de Fleurs	BIVIA139

Bigaradier	SRA851	<i>C. aurantium</i> L.	<i>C. aurantium</i> L.	Australien	BSRA851
Orange douce	IVIA363	<i>C. sinensis</i> (L.) Osb	<i>C. sinensis</i> (L.) Osb	Valencia Late Delta	OIVIA363
Citron	IVIA297	<i>C. limon</i> (L.) Burm	<i>C. limon</i> (L.) Burm	Eureka	CTIVIA297
Citron	SRA16	<i>C. limon</i> (L.) Burm	<i>C. limon</i> (L.) Burm	Lisbonne	CTSA16
Citron	SRA778	<i>C. limon</i>	<i>C. jambhiri</i> Lush.	Rough lemon	CTSA778
Citron	SRA729	<i>C. limon</i>	<i>C. limonia</i> Osbeck	Volkameriana	CTSA729
Lime	SRA777	<i>C. limon</i>	<i>C. limonia</i> Osbeck	Lime Rangpur	LSRA777
Lime	IVIA164	<i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	<i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	Mexicaine	LIVIA164
Lime	IVIA305	<i>C. aurantifolia</i>	<i>C. limettioïdes</i> Tanaka	Douce de Palestine	LIVIA305
Lime	SRA697	<i>C. aurantifolia</i>	<i>C. limettioïdes</i> Tanaka	Douce Brésilienne	LSRA697
Alemow	SRA779	<i>C. aurantifolia</i>	<i>C. macrophylla</i> Wester	Alemow	ALSRA779
Pomélo	SRA470	<i>C. paradisi</i> Macf	<i>C. paradisi</i> Macf	Duncan	POSRA470
Pomélo	SRA293	<i>C. paradisi</i>	<i>C. paradisi</i> Macfad.	Star Ruby	POSRA293

*(I) Germoplasme de l'IVIA. (ICVN) International Citrus Variety Numbering. (SRA) Germoplasme de la Station de Recherche Agronomique de San Guiliano de Corse (INRA)

De l'ADN génomique de poids moléculaire élevé a été extrait à partir des feuilles de ces 54 agrumes "vrais" et leurs espèces apparentées en utilisant le DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen S.A.; Madrid, Espagne).

2-2- Gènes candidats et amorces relatives

Dans le cadre du projet Européen INCO CIBEWU: "*Citrus Breeding for efficient water and nutrient use*", des gènes candidats ont été identifiés d'une part à partir d'analyse d'expression de gènes (microarrays et RT-PCR, Workpackage WP3) et de cDNA-AFLP (Workpackage WP5) de porte-greffes tolérants et sensibles sous conditions contrôlées et de stress salin et d'autre part en se référant à la littérature. Au total, vingt gènes ont été sélectionnés pour des études de diversité allélique concernant des gènes candidats pour la tolérance à la salinité. Six sont associés à l'osmorégulation, 11 au transport ionique et 3 à la production ou la détoxification des ROS. Pour notre étude, 6 gènes putatifs de tolérance à la salinité ont été retenus: 1 associé à l'osmorégulation (*Tsc*), 3 transporteurs ioniques (*Sos1*, *Ccc1*, *Nrt1ac264-97/459*) et 2 liés au stress salin et oxydatif (*Aoc* et *Lapx*) (Tableau 17). Les amorces ont été désignées à partir de séquences EST correspondant aux 6 gènes disponibles dans les bases de données internationales (GenBank, EMBL; Tableau 17), en utilisant le programme Primer3 (Rozen et Skaletsky, 2000) pour amplifier des fragments allant de 321 pb à 1093 pb.

Tableau 17. Gènes candidats présélectionnés pour leur étude de diversité allélique

Voie Biosynthétique	Gène	Taille EST (pb)	Séquences des amorces Forward (F) et Reverse (R) (5'-3')	AT	RABG	Fonction potentielle et références
Tolérance au stress salin	Salt Overly Sensitive 1 (<i>Sos1</i>)	579	F: ACCAGTCAGACAACCATTTG R: CCAATTAGCACCTCATAGAGAC	55 58	DN959478	<i>Antiport Membranaire</i> Na ⁺ /H ⁺ permettant la protection du gradient K ⁺ par exclusion des Na ⁺ hors du cytoplasme lors d'un stress salin (détoxification de Na ⁺). <i>Plant Physiology</i> , 2004, Vol. 136, pp. 2548–2555
Détoxification cellulaire	Cation chloride cotransporter (<i>Ccc1</i>)	1093	F: GCAGCTTGCTACCTACATTGAC R: ACTGAACTCCACATCCCAAAAG	60 58	FN662480	<i>Cotransporteur</i> Na ⁺ /K ⁺ /Cl ⁻ pour l'homéostasie du chlorure. <i>Plant Journal</i> , 2007, Vol.50, pp. 278-292
Tolérance au stress salin	<i>Nrt1ac264-97/459</i>	285	F: ACTGCAAGCTCCGTCATACA R: AAGATGCTGCTGGGATTTTG	57 55	EY746774.1	<i>Symport</i> H ⁺ /Anion ⁻ putatif à faible affinité. <i>Funct. Integr. Genomics</i> , 2009, Vol. 9, pp. 293-309
Métabolisme Aldarate et ascorbate	Ascorbate oxydase (<i>Aoc</i>)	802	F: TCAGTGAGAACCCTAAAGC R: CAGTACAACCCAGTAAGC	58 60	DY293375	Augmente la sensibilité au stress salin et la production des ROS. La fonction de l'Ascorbate Oxydase chez le tabac <i>Plant Physiology</i> , July 2003, Vol. 132, pp. 1631–1641 L'expression supprimée du gène d'AO apoplastique sous condition de stress salin augmente la tolérance au sel chez les plantes d' <i>Arabidopsis</i> et du tabac. <i>Journal of Experimental Botany</i> , 2005, Vol. 56, No. 417, pp. 1785–1796
	Ascorbate peroxidase (<i>Lapx</i>)	321	F: CAGCGGGGACTTATGACG R: GCCCTCCGGTAACTCAAC	58 59	EU719653	Production d'antioxydant (L-ascorbate). Photosynthèse et production de graines sous des conditions de déficit hydrique chez des plantes de tabac transgéniques qui surexpriment le gène Ascorbate Peroxidase d' <i>Arabidopsis</i> . <i>Crop Sci.</i> 2003, Vol. 43, pp.1477–1483. La régulation d'ascorbate peroxidase au niveau de la transcription est impliquée dans la tolérance au stress dû au déficit hydrique de post-récolte chez les fleurs coupées (<i>Rosa hybrida</i> L.) cv. Samantha. <i>Postharvest Biology and Technology</i> , 2006, Vol. 40, pp. 236–243
Métabolisme sucre/amidon	Tréhalose-6-Phosphate Synthase (<i>Tsc</i>)	505	F: TGCAGAACCTGTAATGAAGC R: CTGGTAGGATGCCGACTTAG	58 62	FC875388	Augmente la résistance au stress par production de tréhalose (métabolisme du sucrose et de l'amidon). L'expression d'une fusion bifonctionnelle de gènes d' <i>Escherichia coli</i> pour le Tréhalose-6-Phosphate Synthase et le Tréhalose-6-Phosphate Phosphatase chez les plantes de riz transgéniques, augmente l'accumulation du Tréhalose et la tolérance au stress abiotique sans retard de croissance. <i>Plant Physiology</i> , 2003, Vol. 131, pp. 516–524 La tolérance au stress abiotique chez la tomate est améliorée par la biosynthèse de Tréhalose. <i>Plant Science</i> , 2005, Vol. 169, pp. 75–82

AT: température d'hybridation; RABG: référence de la séquence dans Genebank

2-3- Amplification PCR

Les ADN des 55 accessions à analyser ont été amplifiés par PCR à l'aide des 6 amorces correspondant aux gènes candidats présélectionnés (Tableau 17). Les réactions PCR ont été réalisées dans un volume total de 25 µl contenant 10 ng d'ADN génomique, 0.3 µM de chaque amorce, 300 µM de chaque dNTP, 2.5 µl de tampon 10X PCR (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.01% glycérol), et 0.4 unités de l'enzyme *Taq* polymérase (Fermentas). Les réactions PCR ont été effectuées dans un thermocycleur de type Mastercycler EP Gradient S (Eppendorf). Le programme d'amplification débute par une dénaturation à 94°C pendant 4 min suivie de 40 cycles d'amplification de: dénaturation à 94°C pendant 30s, hybridation au T_m du couples d'amorces (55-58-60°C) pendant 30s et élongation à 72°C pendant 60s. A la fin des cycles, une dernière élongation à 72°C pendant 7 min est appliquée.

Les échantillons amplifiés ont été gardés à 4°C avant d'être analysés. Les produits d'amplification sont révélés par électrophorèse sur gel d'agarose 2%. Un µl de chaque produit PCR obtenu est mélangé à 2µl d'eau stérile et 1 µl de bleu de charge (loading dye agarose 6x). Le mélange à 5µl est chargé sur un gel d'agarose 2%. Un marqueur de taille (1kb ladder) est utilisé. L'électrophorèse est effectuée dans un tampon TAE 0.5X. Le gel est soumis à une pré-migration durant 30 min puis à une migration à un voltage électrique constant de 100V durant 30-45 min, en fonction de la taille attendue des produits d'amplification. Le gel est ensuite transféré dans un bac contenant une solution de coloration (45 ml d'eau stérile, 1 ml NaCl 5M, 15 µl Gel Red (GelRed Nucleic Acid Stain, BioTium)); le tout est mis 15 min sur un agitateur orbital. Une visualisation des produits d'amplification est réalisée à l'aide d'un Gel-doc (Gel documentation system).

La purification des produits PCR a ensuite été réalisée directement ou après avoir coupé des bandes uniques sur gel d'agarose, en utilisant respectivement le Kit de purification des produits PCR QIAquick® (Qiagene, Hollande) et le kit d'extraction de gel QIAquick (Qiagene, Hollande). Les amplicons purifiés des 6 gènes pour les 54 génotypes ont été séquencés.

2-4- Séquençage des fragments de gènes

Les séquençages ont été réalisés selon la méthode conventionnelle *Sanger* à partir de l'extrémité 5'. Ces séquençages ont été effectués par la société Beckman Coulter Genomics (Formerly Agencourt Bioscience and Cogenics) au Royaume-Uni.

2-5- Analyse du polymorphisme de séquences

Les séquences ont été nettoyées, alignées et vérifiées manuellement en utilisant le logiciel BioEdit (éditeur d'alignement de séquences biologiques) (Hall, 1999) et SeqMan version 7.0.5.3. Le nettoyage des *reads* s'est fait visuellement en vérifiant la qualité des chromatogrammes F et R et en contrôlant plus particulièrement la conformité des séquences chevauchantes issues des lectures F et R. Après le nettoyage des séquences individuellement, l'alignement de toutes les séquences ensemble est réalisé et toutes les régions ambiguës (contenant des gaps et/ou mal alignées) sont éliminées. Les séquences propres sont vérifiées aussi afin d'avoir une même longueur commune et interprétable pour toutes les séquences.

Parmi les paramètres de polymorphisme étudiés : le paramètre de diversité nucléotidique (π) (Nei et Li, 1979; Nei et Tajima, 1981) qui est le nombre moyen de différences nucléotidiques par site lors de comparaisons par paires entre séquences d'ADN (Nei, 1987). π dépend aussi bien du nombre de sites polymorphes que de leur fréquence selon la formule:

$$\pi = \sum \pi_{ij} / (n(n-1)/2)$$

où π_{ij} correspond à la proportion des différences nucléotidiques entre la $i^{\text{ème}}$ et la $j^{\text{ème}}$ séquence et n est le nombre d'individus.

Un autre paramètre étant la diversité haplotypique (DH) calculée selon la formule:

$$DH = (n/n-1)(1 - \sum f_i^2) \text{ (Nei, 1987)}$$

Où f_i est la fréquence du $i^{\text{ème}}$ haplotype et n est le nombre d'individus analysés.

L'estimation des paramètres de polymorphisme nucléotidique (sites de ségrégation S , diversité nucléotidique, π) ainsi que des divergences interspécifiques a été obtenue avec le logiciel DnaSP v. 5.010.01 (<http://www.ub.es/dnasp>).

Afin d'identifier les régions codantes et non-codantes, les séquences d'ADN génomique ont fait l'objet d'analyse de type Blast en utilisant les bases de données des protéines (Blastx) sur NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Pour chaque fragment de gène cible, le nombre d'haplotype, la diversité haplotypique ainsi que son écart-type ont été estimés avec le logiciel DnaSP en utilisant les procédés de simulations coalescentes. Le nombre moyen d'allèle par locus, l'hétérozygotie attendue calculée sans biais (Nei, 1978), l'hétérozygotie observée, l'indice de fixation de Wright (Fw; Wright, 1978) et le paramètre Fstat (Fst) ont été calculés en utilisant le logiciel GENETIX v. 4.03.

Les polymorphismes relatifs aux InDel n'ont pas été considérés dans cette étude.

2-5- Analyse phylogénétique

Plusieurs analyses ont été réalisées avec le logiciel Phylemon 2.0 (<http://phylemon.bioinfo.cipf.es>; Sanchez *et al.*, 2011) afin de déterminer le modèle qui correspond le mieux à notre jeu de données. Parmi les méthodes statistiques de ce logiciel, l'outil PhyML Best AIC Tree (v. 1.02b), qui met en œuvre un modèle de programme test (Posada et Crandall, 1998) effectuant des tests de rapport de vraisemblance (Likelihood Ratio Tests, LRTs) d'une manière ordonnée utilisant les critères Akaike (AIC), a généré l'arbre qui s'accorde le mieux aux données.

La construction de l'arbre de Maximum de Vraisemblance a été faite en réalisant 1000 ré-échantillonnages, en ayant supposé des taux uniformes parmi les sites de mutation et supprimé les espaces vides et les sites manquants. Les arbres ont été dessinés en utilisant l'outil TreeDyn 198.3 trouvé sur le site www.phylogeny.fr (Dereeper *et al.*, 2008). *Severinia buxifolia* (Poir.) Ten, une espèce apparentée au genre *Citrus*, a été utilisée pour raciner les arbres.

2-6- Analyse Neighbor-Joining (NJ)

Pour chaque gène et pour tous les gènes pris ensemble, l'organisation de la diversité des accessions d'agrumes a été analysée avec le logiciel DARwin (Perrier et Jacquemoud-Collet, 2006). Pour chaque gène, les loci polymorphes (SNPs) ont été notés comme donnée di-allélique pour calculer la matrice de dissimilarité génétique en appliquant le coefficient de

dissimilarité *simple matching* (d_{ij}) entre les paires d'accessions (unités) (Perrier et Jacquemoud-Collet, 2006).

$$d_{ij} = 1 - \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L m_l / 2$$

où d_{ij} représente la dissimilarité entre les individus i et j , L représente le nombre de locus et m_l indique le nombre d'allèles assortis entre i et j pour le locus l .

A partir de la matrice de dissimilarité obtenue, un arbre Neighbor-Joining (Saitou et Nei, 1987) a été calculé en utilisant le logiciel DARwin version 5.0.159 (*D*issimilarity *A*nalysis and *R*epresentation for *W*indows, <http://darwin.cirad.fr/darwin>) (Perrier *et al.*, 1999). La robustesse des nœuds a été testée en appliquant 1000 ré-échantillonnages (bootstraps).

2-7- Analyse en composantes principales (ACP)

L'analyse en composantes principales a été effectuée avec le logiciel XLSTAT version 2012.2.02 (<http://www.xlstat.com>). Pour chaque gène, la matrice des données SNPs a été transformée en matrice des fréquences alléliques. Cette dernière matrice a servi au logiciel XLSTAT pour l'analyse en composantes principales.

III- Résultats et interprétations

3-1- Découverte des SNPs et analyse de la diversité des loci polymorphes

Pour les 6 gènes, un total de 3305 pb ont été séquencées avec succès et alignées pour tous les génotypes de référence et Tunisiens analysés au sein du genre *Citrus*. 121 loci SNPs polymorphes ont été identifiés. Parmi les 3305 pb, 2697 pb correspondent à des régions codantes et 608 pb à des séquences non codantes (Tableau 18). 51 SNPs additionnels, spécifiques de l'outgroup, *Severinia buxifolia*, ont été obtenus. La fréquence des SNPs est en moyenne de 32 SNPs/kb pour les régions codantes et 56 SNPs/kb pour les régions non codantes. Au sein de notre échantillon du genre *Citrus*, tous les loci SNPs étaient di-alléliques. Parmi les polymorphismes décrits, 64.65% étaient des transitions ($A/G \approx C/T$) et 35.35 % étaient relatives aux transversions ($A/C \approx A/T > G/T > C/G$).

Tableau 18. Polymorphisme des séquences nucléotidiques des gènes pour tous les échantillons analysés

Gène	SP	SA	TG	SC	SNC	SNPc	Fréquence	SNPnc	Fréquence
Aoc	716	802	800	664	52	18	27.108	-	-
Lapx	282	321	400	163	119	4	24.540	5	42.017
Ccc1	820	1093	850	817	3	28	34.272	-	-
Tsc	582	505	800	450	132	9	20	6	45.455
Nrt1a	330	285	400	243	87	15	61.728	6	68.965
Sos1	575	579	1000	360	215	13	36.111	17	79.069
Total	3305			2697	608	87	33.959	34	58.876

Séquence propre (SP), Séquence amplifiée attendue EST (SA), Taille génomique (TG), Région de séquence codante (SC), Région de séquence non codante (SNC), SNP sur région codante (SNPc), SNP sur région non codante (SNPnc)

En ne considérant que les taxons ancestraux (espèces secondaires exclues), le taux de polymorphisme est de 25.6 SNP/kb pour les régions codantes, et 49.34 SNP/kb pour les régions non codantes, avec un total de 99 loci SNPs polymorphes. Ainsi, les espèces secondaires apportent un polymorphisme additionnel pour 22 loci par rapport à notre échantillon des taxons ancestraux.

En comparant les taxons de base des agrumes entre eux, on a cherché à identifier les loci présentant des allèles spécifiques pour chaque taxon. Ces allèles spécifiques à un taxon donné n'existent que chez ce taxon et sont absents chez les autres taxons ancestraux. Pour un locus donné, les allèles spécifiques d'un taxon ancestral peuvent se présenter tous à l'état homozygote, ou au moins un génotype de ce taxon présente l'allèle spécifique à l'état hétérozygote, dans ce cas le locus est polymorphe au sein de l'espèce. *C. reticulata* a présenté 32 loci spécifiques dont 30 présentent du polymorphisme intra *C. reticulata* suivis de *C. medica* (14 dont 3 polymorphes), *C. maxima* (13 dont 11 polymorphes) et Papedas (3 loci dont 2 polymorphes) (Tableau 19). De larges différences dans le nombre de loci polymorphes ont aussi été observées parmi les espèces secondaires et les hybrides, *C. aurantium* a révélé 60 sites SNPs polymorphes, *C. sinensis* avait 35 loci polymorphes, *C. limon* 83, *C. aurantifolia* avait 71, *C. paradisi* 25, et *C. clementina* 25 sites polymorphes (Tableau 20).

Tableau 19. Nombre de SNPs spécifiques par gène et par groupe "ancestral".

Pour chaque gène analysé, le 1^{er} nombre indique le nombre total de SNPs spécifiques pour le taxon en question, à partir de cette valeur un 2^{ème} nombre indique le nombre total de SNPs polymorphes

Groupe	<i>Aoc</i>	<i>Lapx</i>	<i>Ccc</i>	<i>Ts</i>	<i>Nrt</i>	<i>SosI</i>	Total	Total SNPs polymorphes en intraspécifique
<i>C. reticulata</i>	8/7	0	7/7	3/3	4/4	10/9	32	30
<i>C. maxima</i>	1/1	3/3	2/2	1/1	2/2	4/2	13	11
<i>C. medica</i>	5/1	0/0	2/0	2/0	3/1	2/1	14	3
<i>C. micrantha</i>	0	1/1	0	1/1	0	1/0	3	2
Total	23	12	24	15	13	33	62	46

Tableau 20. Nombre de loci SNP polymorphes par gène et par groupe d'hybrides et espèces secondaires

Groupe	<i>Aoc</i>	<i>Lapx</i>	<i>Ccc</i>	<i>Ts</i>	<i>Nrt</i>	<i>SosI</i>	Total
<i>C. clementina</i>	9	0	7	2	7	0	25
<i>C. aurantium</i>	10	5	16	2	13	14	60
<i>C. sinensis</i>	9	3	1	1	9	12	35
<i>C. limon</i>	12	5	20	12	11	23	83
<i>C. aurantifolia</i>	10	5	16	9	9	22	71
<i>C. paradisi</i>	9	3	2	1	8	2	25

Parmi les 22 allèles qui ont été identifiés chez les espèces secondaires et les hybrides (qui n'étaient pas présents chez les taxons ancestraux), 13 sont hétérozygotes chez *C. aurantium*, dont 4 (trouvés dans les gènes *Aoc*, *Ccc*, *Nrt1a*) sont partagés avec des citronniers et un (pour le gène *Nrt1a*) est partagé avec des orangers. Les autres allèles trouvés spécifiquement chez les espèces secondaires se répartissent de la manière suivante: 1 allèle hétérozygote chez *C. sinensis*, 7 chez *C. limon*, 6 chez *C. volkameriana*, 1 pour *C. macrophylla* et 1 pour *C. paradisi*.

En ne considérant que les génotypes tunisiens, cette analyse gène à gène a montré que pour le gène *Aoc*, 6 bigaradiers sur 10 possédaient un allèle non présent chez les taxons de bases (*Aoc*- 343), dont 5 étaient homozygotes pour cet allèle. Cet allèle est également présent chez les 2 bigaradiers de référence (Maroc et bouquet de fleurs).

Ce même allèle hétérozygote est partagé par 2 citronniers tunisiens, citron Arbi 111 et citron 133) et les 2 citronniers de référence (Eureka et Lisbonne). Avec le gène *Ccc*, 9 sur 10 des bigaradiers tunisiens étaient hétérozygotes pour l'allèle spécifique au locus (*Ccc*-166) (bigaradier 3-190), lequel allèle est retrouvé chez les 2 bigaradiers de référence Maroc et bouquet de fleurs. Absents chez les bigaradiers de référence, trois autres allèles (*Ccc*-186, *Ccc*-267 et *Ccc*-282) caractérisaient le 'bigaradier 3' hétérozygote. Les deux derniers sont partagés avec le citronnier tunisien 133. Un allèle au locus (*Ccc*-285) a caractérisé le 'bigaradier 158' (hétérozygote), suivi par l'allèle (*Ccc*-371) pour lequel le 'bigaradier 1' était hétérozygote et le 'bigaradier 43' était homozygote. Le citronnier Arbi 111 était hétérozygote pour un allèle spécifique au locus *Ccc*-664 qu'il partage avec uniquement *C. volkameriana*. Pour le gène *Nrt1a*, le profil hétérozygote *Nrt1a*-103, caractérisaient tous les bigaradiers Tunisiens sauf le bigaradier 11, les bigaradiers Maroc et bouquet de fleurs, ainsi que les deux citronniers Tunisiens Arbi 111 et 133, et les citronniers de référence Eureka et Lisbonne.

Quant à *Sos1*, seuls deux allèles uniques hétérozygotes étaient spécifiques aux génotypes Tunisiens et absents chez les bigaradiers de référence, le site *Sos1*-355 pour le 'bigaradier 11' et le site *Sos1*-367 pour 9 bigaradiers sur 10.

Le taux moyen d'hétérozygotie observée chez les quatre taxons ancestraux est très faible ($H_o=0.059$), et 54.54% des SNPs détectés sont homozygotes pour tous les individus ($H_o=0$) de ces taxons. Les sites les plus hétérozygotes ont été trouvés pour 2 loci du gène *Nrt1a* (SNP63 et 95), avec une $H_o=0.45$.

3-2- Analyse de la diversité à l'échelle intra et inter-taxon- écart au modèle d'Hardy Weinberg et niveau de différenciation entre espèces

Nous avons utilisé les matrices de dissimilarité inter-individuelle générées par le logiciel Darwin 5, pour estimer les taux moyens du polymorphisme inter-accession (SNPs/kb) au sein et entre les taxons de base et leurs hybrides (Tableau 21). Il en ressort que, pour les taxons ancestraux" les taux moyens de polymorphisme intra-taxon et inter-taxon étaient 1.92 SNPs/kb et 11.25 SNPs/kb respectivement.

Tableau 21. Degrés de polymorphisme inter-accession au sein et entre les taxons de base (en gras) et leurs hybrides avec la fréquence des SNPs chez un seul taxon de base.

Diagonale: dissimilarités moyennes entre deux accessions au sein des taxons (SNP/kb).

Intersection: dissimilarités moyennes entre deux accessions entre taxons (SNP/kb).

Dernière ligne: fréquence des SNPs spécifiques (trouvés uniquement chez un taxon) (SNPs/kb).

SNP/Kb	<i>C. reticulata</i>	<i>C. maxima</i>	<i>C. medica</i>	<i>C. micrantha</i>	<i>C. aurantium</i>
<i>C. reticulata</i>	3.86				
<i>C. maxima</i>	10.33	1.44			
<i>C. medica</i>	12.09	7.30	0.48		
<i>C. micrantha</i>	13.92	11.50	12.37	-	
<i>C. aurantium</i>	7.02	6.67			
<i>C. sinensis</i>	6.55	5.73			
<i>C. limon</i>			5.95		6.97
<i>C. aurantifolia</i>			5.05	10.06	
SNPs spécifique	9.68	3.93	4.23	1	

Les taux des SNPs/Kb intra-taxon variaient de 0.48 pour *C. medica* à 3.86 pour *C. reticulata*. Les taux interspécifiques variaient de 7.30 entre *C. medica* et *C. maxima* à 13.92 entre *C. reticulata* et *Papeda* suivi de 12.37 entre *C. medica* et *Papeda*. Le taux de polymorphisme trouvé entre *C. reticulata* et *C. maxima*, ces deux espèces supposées avoir donné lieu aux *C. aurantium*, *C. sinensis*, *C. paradisi* et à la clémentine, était de 10.33 SNPs/kb.

Si on considère chacune des espèces secondaires comparée avec ses espèces parentales putatives, il s'avère que le bigaradier a des niveaux de différenciation similaire avec *C. reticulata* (7.02) et *C. maxima* (6.67). L'orange présente un taux de polymorphisme légèrement supérieur avec le mandarinier (6.55) qu'avec le pamplemoussier (5.73). Il est à noter que le bigaradier apparaît légèrement plus différencié que l'oranger par rapport aux

échantillons de pamplemoussier et de mandarinier de notre analyse. C'est un résultat logique puisque le bigaradier présente des allèles qui n'ont pas été observés dans ces échantillons.

Le cédrat est généralement considéré comme l'un des parents des citrons et des limes. Il présente des taux de polymorphisme de 5.95 avec les premiers et de 5.05 avec les seconds. Les citronniers ont révélé un taux de polymorphisme de 6.97 avec leur 2^{ème} parent putatif, le bigaradier. Le taux de polymorphisme le plus élevé a été noté entre les limes et le 2^{ème} parent putatif de la lime mexicaine *C. micrantha* (10.06). Dans la mesure où la différenciation entre les cédrats et *C. micrantha* est de 12.37 cela suggère que *C. micrantha* n'a pas participé directement à la genèse de certains limettiers de notre échantillon.

Les nombres moyens de SNPs par kb spécifiques à un taxon donné (présents au moins chez un génotype de ce taxon) étaient relativement proches pour *C. maxima* et *C. medica* avec une moyenne de 4 SNPs/Kb. Alors qu'un taux révélé plus élevé a été observé pour *C. reticulata* (9.68) et un autre moins élevé chez Papeda (1).

Les données des SNPs révélés pour chaque gène et au niveau de chaque taxon ont aussi été analysées avec le logiciel Genetix pour estimer le niveau de structuration intra et interspécifique. Les moyennes des données obtenues pour tous les loci SNPs analysés dans cette étude sont présentées dans le tableau ci-dessous (Tableau 22).

Tableau 22. Résumé statistique de la diversité des marqueurs SNPs

	SNP			
	He n.b.	Ho	F _w	N
<i>C. reticulata</i>	0.116	0.093	0.196	1.33
<i>C. maxima</i>	0.051	0.052	-0.026	1.15
<i>C. medica</i>	0.019	0.023	-0.237	1.058
<i>C. micrantha</i>	0.025	0.025	-0.008	1.025
<i>C. aurantium</i>	0.191	0.250	-0.307	1.496
<i>C. sinensis</i>	0.190	0.281	-0.478	1.290
<i>C. limon</i>	0.216	0.279	-0.294	1.686
<i>C. aurantifolia</i>	0.207	0.269	-0.298	1.603
Total T. Anc	0.218	0.0591	0.728	1.818
Total E.T	0.227	0.1817	0.198	1.991

Les valeurs moyennes sont représentées sur le tableau. (N) nombre moyen d'allèle par locus; (He n.b.) hétérozygotie attendue calculée sans biais (Nei 1978); (Ho) hétérozygotie observée; (F_w) indice de fixation de Wright (F_w=1-(Ho/He)); (T.Anc) Taxons ancestraux. (E.T) Échantillon total : les 50 accessions analysées.

Le nombre moyen d'allèles par locus, les hétérozygoties observée et attendue ont été estimés pour les 4 espèces ancestrales cibles ($N=1.82$, $H_o=0.059$, $H_e=0.218$). En ajoutant les espèces secondaires, l'analyse de l'échantillon total a montré une forte augmentation de la valeur de H_o (0.1817, presque 3 fois celle obtenue avec uniquement les espèces ancestrales); tandis que les valeurs relatives à N (1.991) et H_e (0.227) n'ont pas beaucoup changé. A l'échelle intraspécifique, toutes les espèces secondaires ont présenté un fort excès d'hétérozygotie observée. Parmi les taxons ancestraux, *C. reticulata* est le seul à présenter un défaut d'hétérozygotie observée relativement à l'hétérozygotie attendue suggérant une plus forte structuration intrataxon que pour *C. medica* et *C. maxima*.

A l'échelle interspécifique, F_w étant un paramètre calculé sur une population globale (sans considérer de sous populations à priori), il renseigne sur la différence entre l'hétérozygotie observée et celle attendue selon l'équilibre d'Hardy Weinberg. Les valeurs positives très élevées pour la population ancestrale (0.728) et toujours positive pour l'échantillon total (0.198), suggèrent un niveau élevé de différenciation entre les taxons de base due à une structuration en sous population entre lesquelles les échanges génétiques sont restés longtemps limités. La chute de F_w sur l'échantillon total et l'hétérozygotie élevée des espèces secondaires est cohérente avec leur origine interspécifique supposée à partir des taxons ancestraux. Pour confirmer ce point, les valeurs de F_{st} correspondant au niveau de différenciation génétique entre taxons de base (en excluant les espèces secondaires) ont été calculées pour chaque gène (Tableau 23).

Tableau 23. Différenciation génétique des espèces ancestrales par gène et pour l'ensemble des gènes étudiés

Gène	Fst		
<i>Aoc</i>	0.773		
<i>Lapx</i>	0.755		
<i>Ccc1</i>	0.825		
<i>Tsc</i>	0.789		
<i>Nrt1a</i>	0.679		
<i>Sos1</i>	0.886		
Nombre de gènes	moyenne	Écart type	Intervalle de confiance (95%)
6	0.785	0.0695	0.0556

Les valeurs pour les différents gènes sont élevées et très voisines. Elles varient entre 0.679 pour *Nrt1a* et 0.886 pour *Sos1* avec une moyenne de 0.785 ± 0.055 .

Contrairement à F_w , F_{st} est calculé sur des sous populations définies à priori. La valeur de la différenciation génétique F_{st} (0.785) est très proche de celle de l'indice de fixation de Wright F_w (0.728), indiquant que l'écart au modèle d'Hardy Weinberg révélé par F_w est principalement expliqué par une limitation des flux de gènes entre les taxons ancestraux. Ceci révèle aussi que les classifications des taxons différenciés représentent la plupart de la hiérarchisation génétique, et donc la réalité génétique de ces sous-populations ancestrales.

3-3- Test statistique de neutralité et structure haplotypique chez les agrumes "vrais", la population totale et l'échantillon Tunisien

Les substitutions des bases nucléiques peuvent être silencieuses (mutation dans une région non codante ou mutation synonyme dans une région codante). Les mutations synonymes n'affectent pas la séquence protéique en raison de la redondance du code génétique (le nouveau triplet code le même acide aminé que le triplet original). Au contraire, les mutations non synonymes entraînent, une modification de l'acide aminé codé, laquelle peut avoir ou non une répercussion sur la fonction de la protéine produite par le gène, dans le cas d'un gène codant, ou sur l'affinité pour un facteur de transcription, dans le cas d'une zone promotrice de l'ADN. La diversité nucléotidique P_i (π), étant le nombre moyen de différences nucléotidiques ou mutation par site entre deux séquences (Nei, 1987; Nei et Miller 1990). Avec le logiciel dnasp 5, on a pu calculer la variation nucléotidique observée pour les séquences des gènes analysés ainsi que les diversités nucléotidiques de substitution des différents sites (synonymes (π_{syn}), non synonymes (π_{nonsyn}) et silencieux (π_{sil})). Les moyennes de ces variations sont résumées pour chaque taxon dans le tableau 24, et pour chaque gène (données non incluses). La moyenne totale de la diversité nucléotidique (π_T) était de 0.009 pour la population totale et la population Tunisienne, variant de 0.001 pour les cédrats et Papeda à 0.006 pour le groupe des mandariniers.

Mis à part Papeda, les diversités nucléotidiques des sites de substitution silencieux (π_{sil}) et synonymes (π_{syn}) étaient similaires pour chacun des taxons de base, ainsi que pour la population ancestrale et l'échantillon total. Pour la population Tunisienne, la diversité nucléotidique des sites de substitution synonymes a été plus élevée que celle des sites

silencieux. Tandis que la diversité nucléotidique non synonyme (π_{nonsyn}) a été 2.66 fois inférieure à celle synonyme (moyenne $\pi_{\text{nonsyn}} = 0.006$).

Pour toute la population, le taux de substitution non synonyme varie entre 0.00219 pour *Aoc* et 0.01796 pour *Nrt1a* et le rapport de diversité non synonyme par diversité synonyme ($\pi_{\text{nonsyn}}/\pi_{\text{syn}}$) varie de 0.07 au gène *Aoc* (sélection hautement conservatrice) à 1.30 pour les gènes *Sos1* et *Nrt1a*, lequel rapport était aussi supérieur à 1 pour ces deux mêmes gènes avec la population ancestrale. Ceci suggère l'implication de contraintes sélectives et/ou d'histoires d'évolution adaptatives différentes entre les gènes analysés *Sos1* et *Nrt1a* (Tableau 25).

En prenant la population Tunisienne, seul *Sos1* présente une proportion élevée de diversité non synonyme ($\pi_{\text{nonsyn}}/\pi_{\text{syn}} = 1.68$). Il est à noter aussi que le locus *NRT1A* en a montré une valeur de 0.92 estimée proche de 1.

Tableau 24. Synthèse des diversités nucléotidiques et des différences notées par les paramètres de diversité

Population	S	π_T	π_{sil}	π_{syn}	π_{nonsyn}	π_{nonsyn}/π_{syn}	π_{nonsyn}/π_{sil}	N_h	DH	DH (SD)
<i>C. reticulata</i>	11.333	0.006	0.011	0.011	0.003	0.389	0.271	6.167	0.750	0.084
<i>c. maxima</i>	3	0.003	0.003	0.004	0.002	0.368	0.699	3.667	0.578	0.095
<i>C. medica</i>	1.167	0.001	0.001	0.001	0.001	0.277	0.149	1.833	0.268	0.109
Papeda	0.5	0.001	0.002	0.000	0.000	-	-	1.5	0.5	0.25
Taxons Ancestraux	16.667	0.009	0.014	0.014	0.006	0.705	0.519	11.000	0.852	0.032
Population totale	20.5	0.009	0.015	0.016	0.006	0.582	0.489	18.833	0.860	0.017
Population Tunisienne	15.8333	0.009	0.015	0.018	0.006	0.551	0.465	9.167	0.811	0.037
max	11.333	0.006	0.011	0.011	0.003	0.389	0.699	6.167	0.750	0.250
min	0.5	0.001	0.001	0	0	0.28	0.149	1.5	0.268	0.084

(S) sites de ségrégation, (π_T) diversité nucléotidique totale, (π_{sil}) diversité nucléotidique des sites silencieux, (π_{syn}) diversité nucléotidique des sites synonymes, (π_{nonsyn}) diversité nucléotidique des sites non synonymes, (π_{nonsyn}/π_{syn}) rapport de la diversité nucléotidique des sites non synonymes par rapport aux sites synonymes, (π_{nonsyn}/π_{sil}) rapport de la diversité nucléotidique des sites non synonymes par rapport aux sites silencieux, (N_h) nombre d'haplotypes, (DH) diversité haplotypique, DH (SD) écart-type de DH.

Les estimations des diversités sont réduites à la longueur des séquences alignées, en ignorant les sites avec données manquantes ou les polymorphismes d'insertion/délétion (indel).

Tableau 25. Test de neutralité des gènes candidats de tolérance à la salinité pour les trois groupes: population ancestrale (PA), population totale (PT) et population Tunisienne (PTu)

	$\pi_{\text{nonsyn}}/\pi_{\text{syn}}$	$\pi_{\text{nonsyn}}/\pi_{\text{syn}}$	$\pi_{\text{nonsyn}}/\pi_{\text{syn}}$
Gene	PA	PT	PTu
<i>Aoc</i>	0.06	0.07	0.09
<i>Lapx</i>	0.19	0.13	0.08
<i>Ccc1</i>	0.15	0.15	0.15
<i>Tsc</i>	0.81	0.54	0.38
<i>Nrt1a</i>	1.84	1.30	0.92
<i>Sos1</i>	1.19	1.30	1.68
Max	1.84	1.30	1.68
Min	0.06	0.07	0.08

À l'échelle intraspécifique, toutes les espèces des taxons de base ont montré des diversités non synonymes très faibles par rapport aux diversités synonymes pour tous les loci, sauf pour les loci *Ccc* avec *C. maxima* ($\pi_{\text{nonsyn}}/\pi_{\text{syn}} = 0.83$), *Nrt1a* avec *C. reticulata* ($\pi_{\text{nonsyn}}/\pi_{\text{syn}} = 0.72$) et *Sos1* avec *C. reticulata* ($\pi_{\text{nonsyn}}/\pi_{\text{syn}} = 0.96$), où on a noté des diversités non synonymes et synonymes très proches.

Pour plusieurs gènes, il y avait certains groupes (*C. medica* et Papeda) qui n'ont pas de mutations synonymes ($\pi_{\text{syn}}=0$), ce qui rend le rapport $\pi_{\text{nonsyn}}/\pi_{\text{syn}}$ impossible à calculer.

Le nombre moyen d'haplotypes par locus pour toute la population est égale à 18.833, avec une valeur maximale de 6.167 haplotypes chez *C. reticulata* suivie de 3.667 pour *C. maxima*, alors qu'une valeur minimale de 1.5 haplotypes a été retrouvée chez Papeda suivie de *C. medica* ($N_h = 1.833$) (Tableau 24).

Le groupe *C. reticulata* a montré la diversité haplotypique la plus élevée (0.75), tandis que le groupe *C. medica* a présenté la valeur la plus faible pour ce paramètre (DH= 0.268).

3-4- Diversité au niveau protéique

D'après nos résultats précédents, les deux gènes *Nrt1a* et *Sos1*, déterminants très importants de la tolérance à la salinité, sont sous sélection positive aussi bien au niveau de l'échantillon

total qu'à l'échelle des taxons ancestraux uniquement. En outre, cette sélection positive est associée à un degré élevé de différenciation allélique entre taxons.

Afin de mieux visualiser les variations au niveau protéique, des alignements des protéines relatives à ces deux gènes chez tous les génotypes étudiés ont été réalisés (Annexe F. II(a,b) et Annexe F.III(a,b)). En comparant tous les génotypes ensemble, certains variants pour le changement d'AA ont montré des sites (X) traduisant l'implication d'un allèle synonyme (comme le standard) et d'un autre non synonyme (différent d'une base). Pour ce site de variation, le génotype est donc hétérozygote pour le changement de l'AA sans pour autant qu'il y ait changement de nom de l'AA. Au contraire, d'autres sites sont homozygotes non synonymes pour le changement d'AA. Dans ce cas, les deux allèles sont identiques mais différents de ceux du standard, entraînant un changement total de l'AA.

Afin de mieux examiner les résultats, on a essayé de décortiquer l'histoire évolutive des protéines issues des deux gènes *Nrt1a* et *Sos1* au niveau de tous les génotypes analysés, y compris les génotypes ancestraux. Les alignements obtenus en annexes FII.b et FIII.b ont permis de tracer les deux arbres phylogénétiques relatifs à *Nrt1a* et *Sos1* (Figure 17 et 18, respectivement).

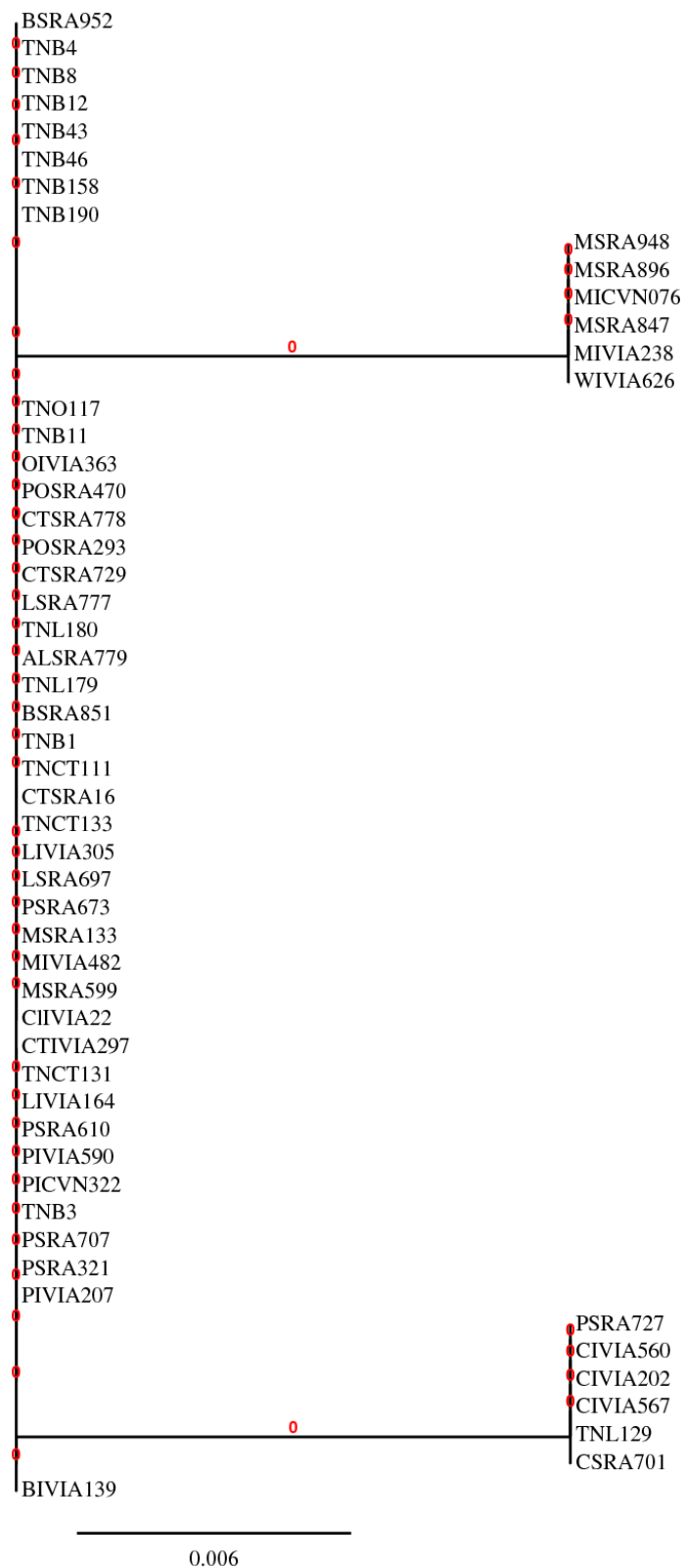


Figure 17. Phylogénie de la structuration de la protéine issue du gène *Nrt1a* chez les taxons de base des agrumes, les hybrides et les accessions tunisiennes

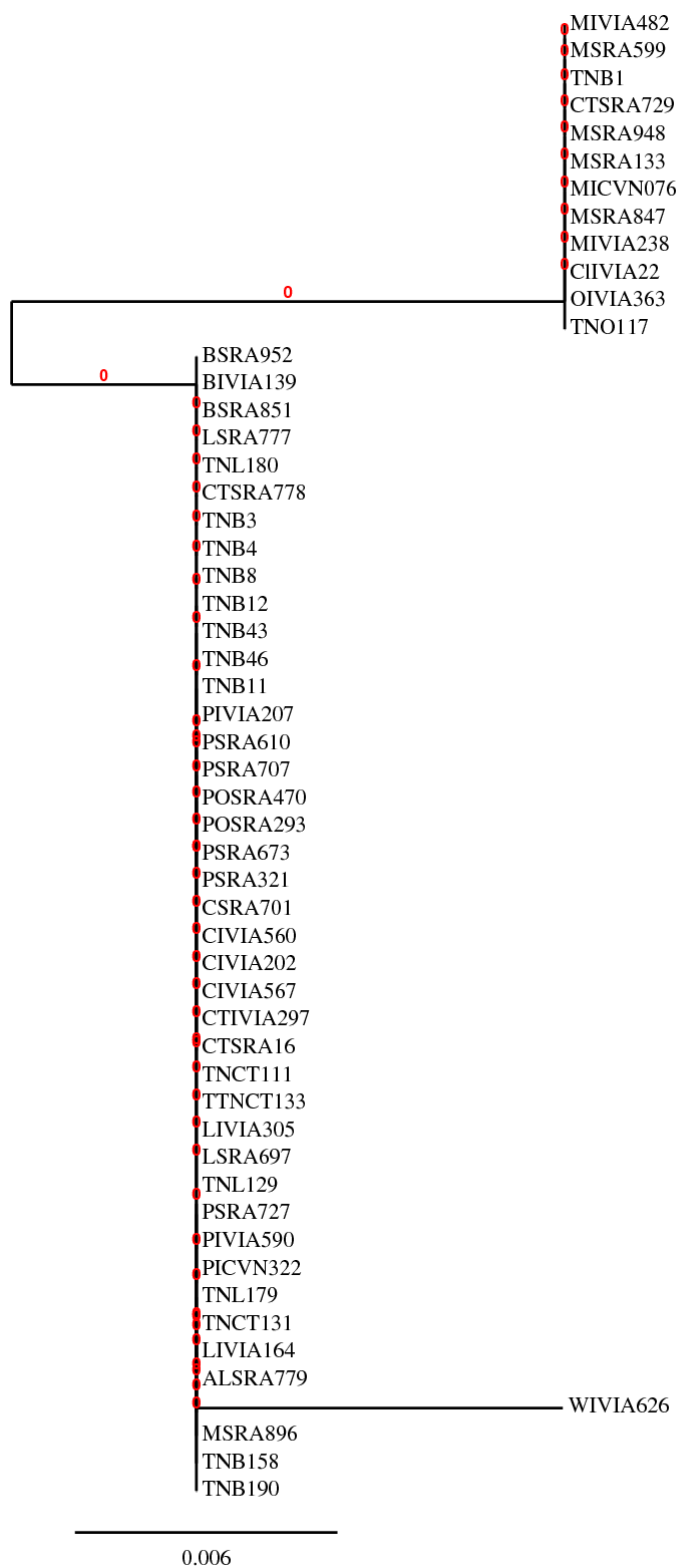


Figure 18. Phylogénie de la structuration de la protéine issue du gène *SosI* chez les taxons de base des agrumes, les hybrides et les accessions tunisiennes

3-5- Analyse de la phylogénie moléculaire

L'analyse phylogénétique a été réalisée sur une base de données éditée en ayant regroupé les 6 séquences des 6 gènes ensemble pour chaque génotype ancestral, créant une séquence unique d'une longueur totale de 3305 pb. Les indels ont été enlevés de cette analyse.

Avec le logiciel Phylemon 2.0 (Sanchez *et al.*, 2011) on a choisi une méthode basée sur le "maximum de vraisemblance". Elle porte directement sur les séquences alignées, et tente de trouver un scénario évolutif qui minimise le nombre total de substitutions nécessaires pour passer d'une séquence à une autre en parcourant l'arbre phylogénétique. Elle a l'avantage de proposer les séquences ancestrales. Souvent considérée comme la "meilleure méthode", c'est-à-dire la plus à même de trouver l'arbre vrai, cette méthode a permis d'explorer un très grand nombre de topologies alternatives (modèles). Pour chaque topologie examinée, on obtient une estimation de son score par confrontation avec les données moléculaires (probabilité des données si topologie est la bonne). Notre choix porte sur la ou le(s) topologie(s) avec le meilleur score. Parmi les méthodes choisies, un nouvel outil, PhyML Best AIC Tree (v. 1.02b), qui met en œuvre un modèle de programme test (Posada et Crandall, 1998) effectuant des tests de rapport de vraisemblance (Likelihood Ratio Tests, LRTs) d'une manière ordonnée utilisant les critères Akaike (AIC), a généré le produit qui s'accorde le mieux aux données (valeur de vraisemblance la plus faible). Ce programme a permis d'inclure l'optimisation de la topologie dans le calcul des vraisemblances, et ce pour tous les modèles testés.

Compte tenu du principe de cette méthode nous l'avons appliqué uniquement aux taxons ancestraux. *Severinia buxifolia* (Poir.) Ten, espèce apparentée au genre *Citrus*, a été utilisée pour raciner les arbres.

Parmi tous les modèles testés avec le logiciel Phylemon 2.0 (Sanchez *et al.*, 2011), mais aussi avec Phylogeny.fr (Dereeper *et al.*, 2008) et Mega 5 (Tamura *et al.*, 2011), le modèle ayant montré le meilleur ajustement était celui de Hasegawa-Kishinoyano (HKY85+I+G). Il prend en compte le modèle de substitution de nucléotides HKY "modèle transitionnel et transversionnel" (2 classes de substitution; AC=AT=CG=GT, AG=CT) (Hasegawa *et al.*, 1985), la proportion de sites invariables (I=0.867), et un taux de catégories de gamma distribué égal à 4 pour justifier le taux d'hétérogénéité à travers les sites (une estimation de gamma est G=1.421). Les relations phylogénétiques entre espèces du genre *Citrus* déduites de ce modèle sont présentées dans la figure 19. La construction de l'arbre de Maximum de Vraisemblance a été faite en réalisant 1000 ré-échantillonnages, en ayant supposé des taux

uniformes parmi les sites de mutation et en ayant supprimé les espaces vides et les sites manquants. L'arbre phylogénétique a été dessiné en utilisant l'outil TreeDyn 198.3 (www.phylogeny.fr; Dereeper *et al.*, 2008).

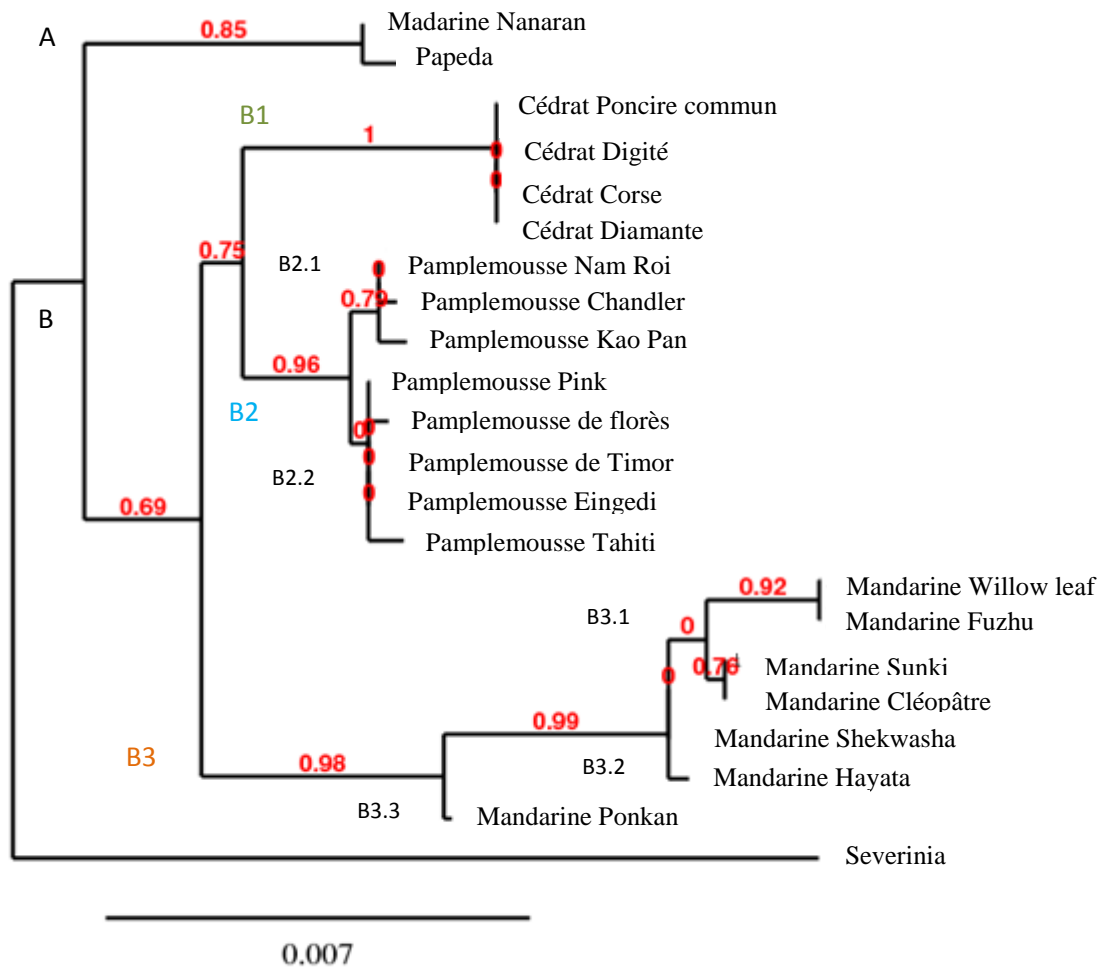


Figure 19. Représentation graphique de l'arbre phylogénétique enraciné des taxons ancêtres, réalisé avec TreeDyn (V.198.3) de Phylogeny.fr
Les valeurs sur les branches sont celles des bootstraps

Les génotypes analysés appartiennent à deux groupes génétiques distincts A et B. Le groupe A est représenté par *C. micrantha* (Papeda) et *C. amblycarpa* (Nasnanan) décrit par certains auteurs comme un hybride de papeda.

Le groupe B représente les 3 taxons de base du genre *Citrus* groupés dans les sous-embranchements: B1, B2 et B3. B1 regroupe les 4 cédrats (accessions de *C. medica*) fortement associés.

Le 2^{ème} grand sous groupe B2 correspond à celui des pamplemoussiers (*C. maxima*), fortement liés les uns aux autres et divisés comme suit: en B2.1 les trois pamplemoussiers Chandler, Nam Roi et Kao Pan. En B2.2 les génotypes Pink, De Florès, De Timor, Eingedi et Tahiti.

B3 comportant les accessions de *C. reticulata*, est divisé à son tour en 3 sous-groupes fortement liés: B3.1 représente le sous-embranchement qui regroupe les mandariniers Fuzhu et Willow leaf ensemble, et les mandariniers Cléopâtre et Sunki ensemble. B3.2 regroupe les mandariniers Shekwasha et *C. depressa* Hayata en structure monophylétique. B3.3 représente un seul génotype à structure monophylétique, le mandarinier Ponkan.

Pour la reconstruction de l'arbre phylogénétique, dans un 2^{ème} temps, on avait choisi la méthode basée sur les distances génétiques. Pour cela, le logiciel Darwin 5 a été mis en œuvre pour les analyses de dissimilarités génétiques des génotypes étudiés. La structure phylogénétique est presque en parfaite concordance avec la structure obtenue avec l'analyse Neighbor-Joining (Figure 20). Dans ce cas, l'association entre *C. amblycarpa* et Papeda est maintenue. De même pour les autres regroupements *C. medica*, *C. maxima* et *C. reticulata*.

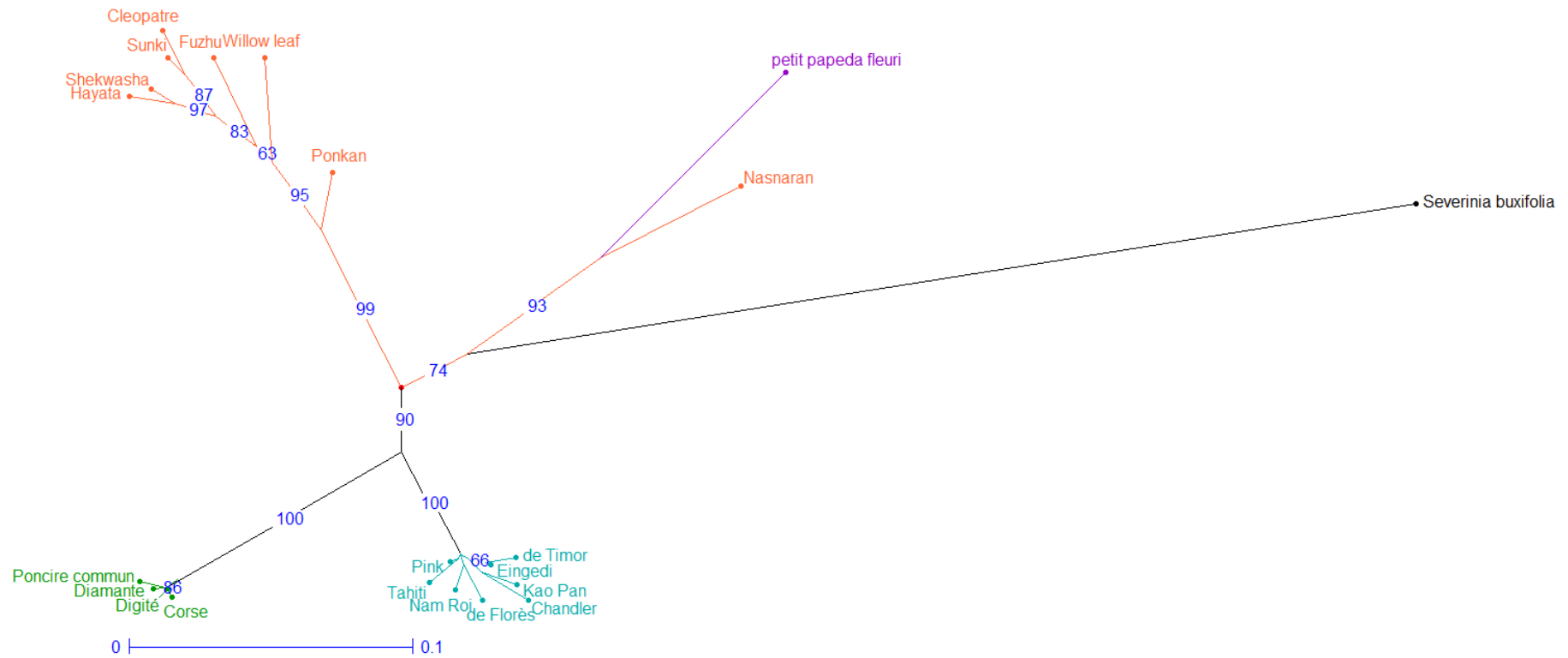


Figure 20. Arbre Neighbor-Joining obtenu avec 121 marqueurs SNPs issus des 6 gènes candidats analysés chez les espèces ancestrales d'agrumes. (1000 bootstraps réalisés). Seules les branches supportant plus de 60% sont représentées.

3-6- Structure génomique des espèces secondaires et des hybrides - cas des accessions Tunisiennes

La structure de la diversité génétique des espèces secondaires a été analysée en ayant ajouté à l'analyse des taxons ancestraux les espèces secondaires et les hybrides interspécifiques (Figure 21). Sur cette figure, *C. reticulata* apparaît toujours plus proche des cédrats que de Papeda comme c'était le cas sur les figures 19 et 20, et *C. medica* est devenu en position centrale entre *C. maxima* et *C. reticulata* et non comme il a été suggéré par l'analyse Phylemon qui excluait les génotypes hybrides.

Afin de décortiquer les relations génétiques entre les différents génotypes en fonction des gènes analysés. Six arbres selon l'algorithme de classification Neighbor-Joining ont été générés à partir des analyses pour chaque gène (Figure 22a-f).

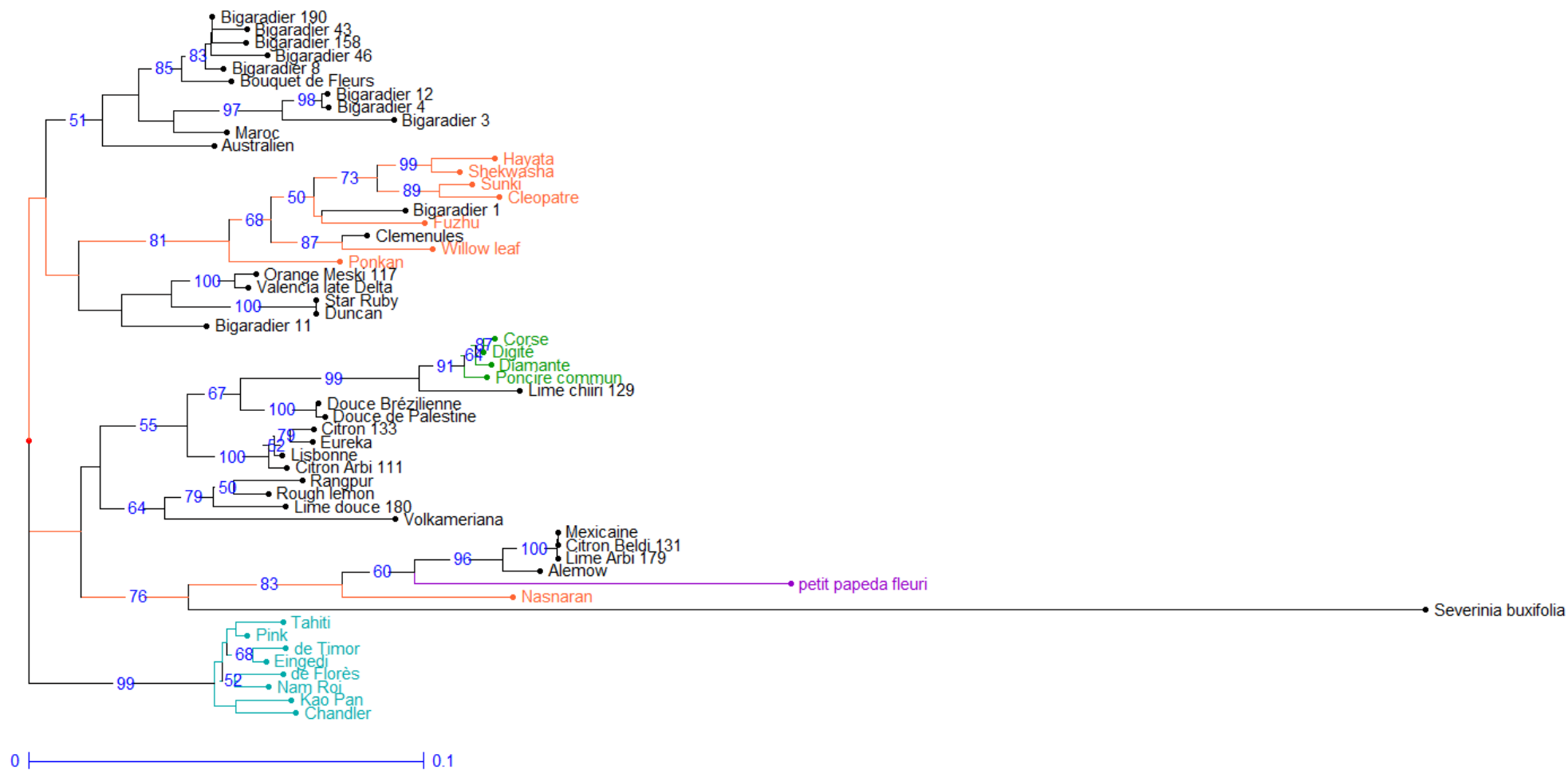


Figure 21. Arbre Neighbor-Joining obtenu avec 121 marqueurs SNPs issus des 6 gènes candidats analysés chez les espèces ancestrales et secondaires des agrumes (1000 bootstraps réalisés). Seules les branches supportant plus de 50% sont représentées.

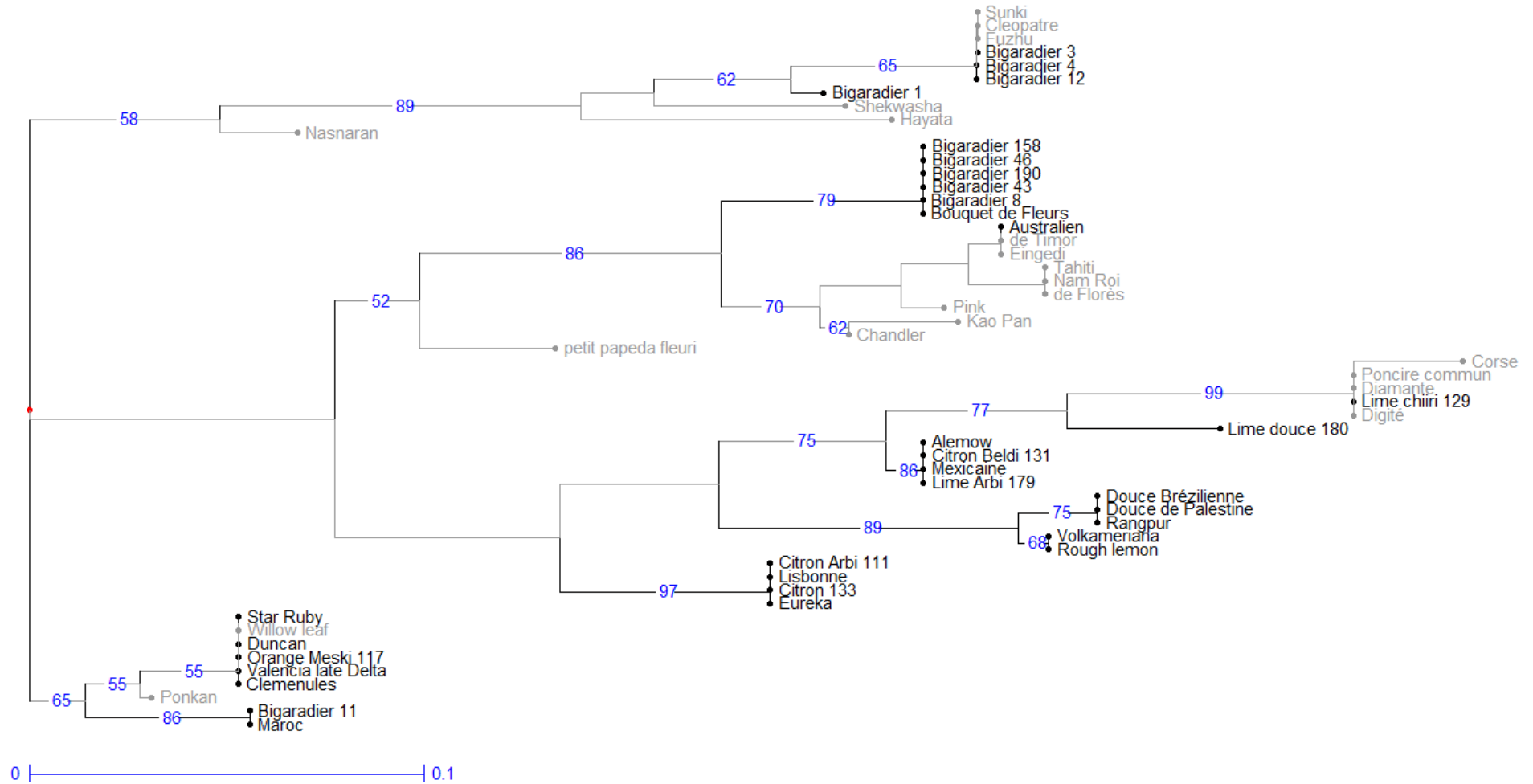


Figure 22a. Arbre Neighbor-joining obtenu avec les 18 marqueurs SNPs issus du gène *Aoc* chez les espèces d'agrumes ancestrales et leurs hybrides (1000 bootstraps réalisés, seuls les supports des branches $\geq 50\%$ sont représentés). Les noms des espèces ancestrales sont mis en gris.

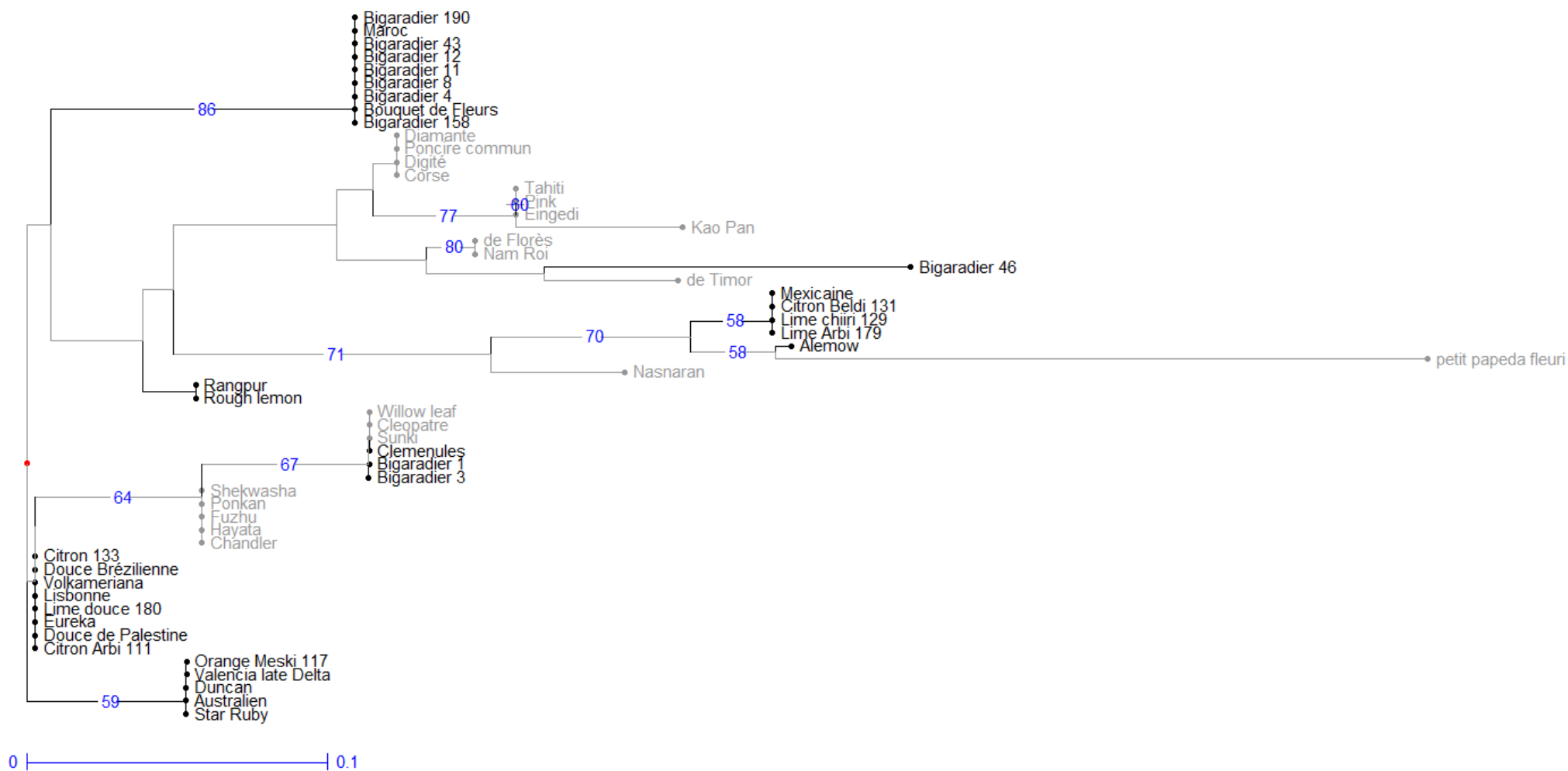


Figure 22b. Arbre Neighbor-joining avec les 9 marqueurs SNPs issus du gène *Lapx* chez les espèces d'agrumes ancestrales et leurs hybrides (1000 bootstraps réalisés, seuls les supports des branches $\geq 50\%$ sont représentés). Les noms des espèces ancestrales sont mis en gris.

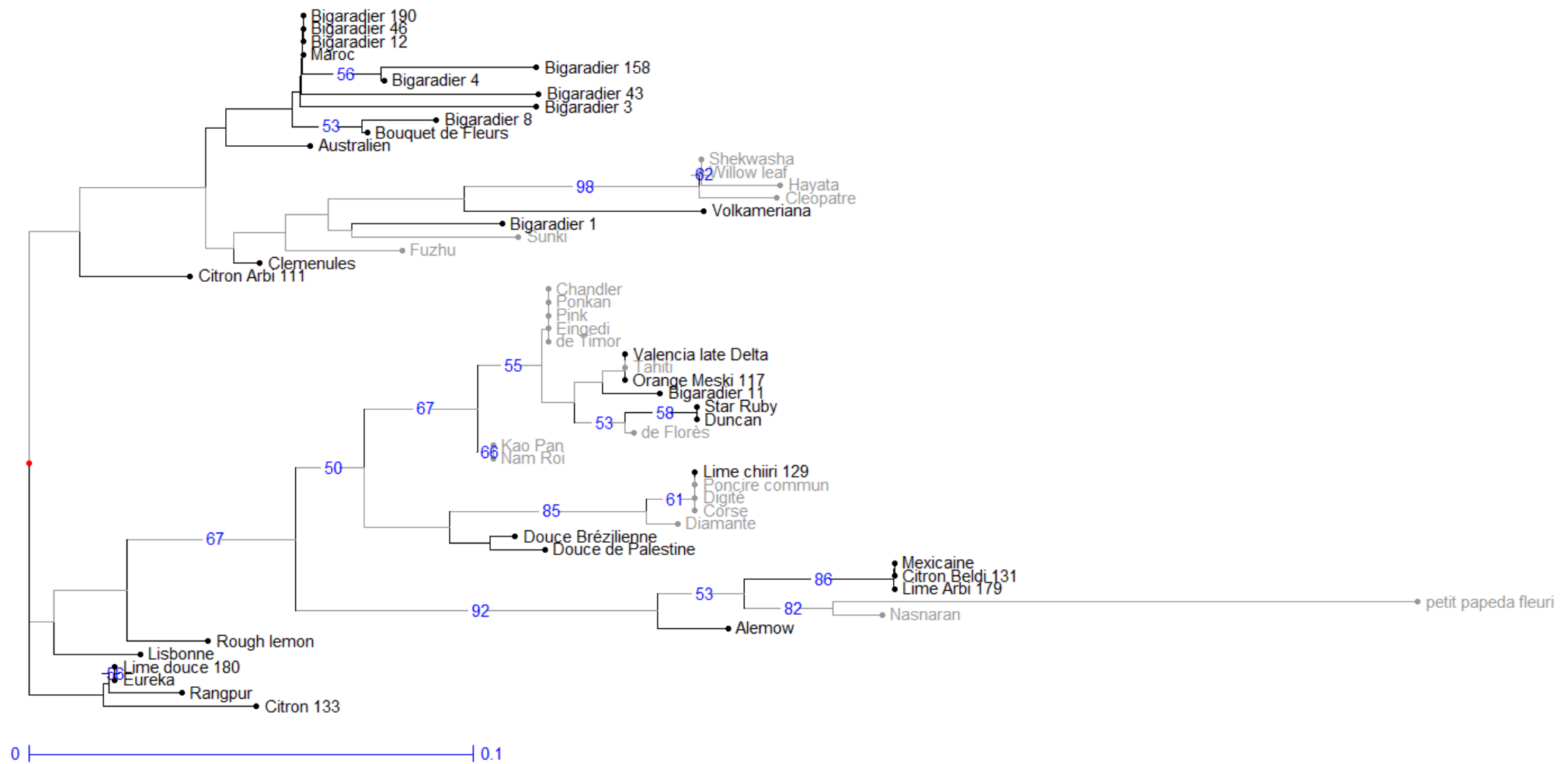


Figure 22c. Arbre Neighbor-joining avec les 28 marqueurs SNPs issus du gène *Ccc* chez les espèces d'agrumes ancestrales et leurs hybrides (1000 bootstraps réalisés, seuls les supports des branches $\geq 50\%$ sont représentés). Les noms des espèces ancestrales sont mis en gris.

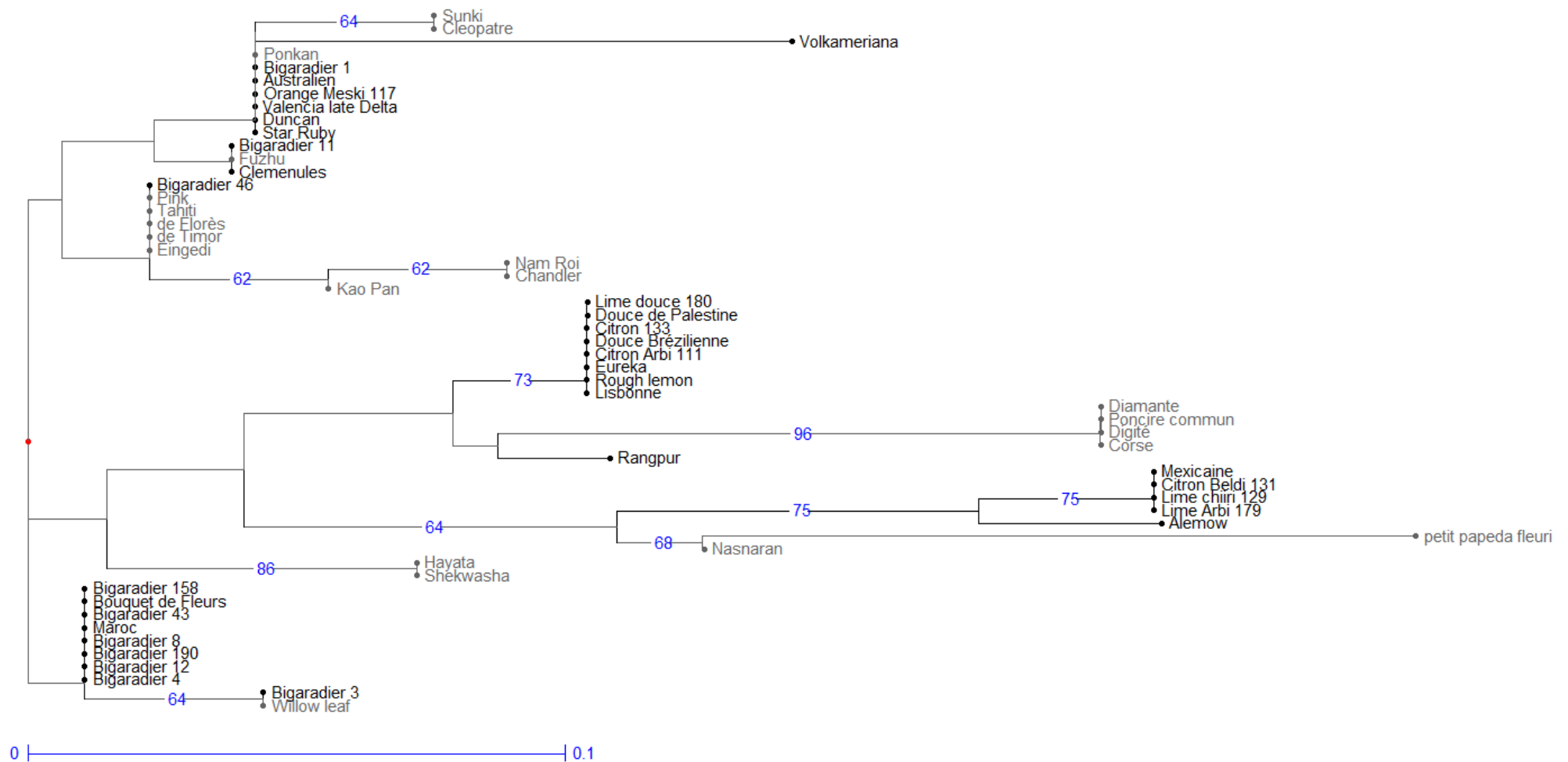


Figure 22d. Arbre Neighbor-joining avec les 15 marqueurs SNPs issus du gène *Ts* chez les espèces d'agrumes ancestrales et leurs hybrides (1000 bootstraps réalisés, seuls les supports des branches $\geq 50\%$ sont représentés). Les noms des espèces ancestrales sont mis en gris.

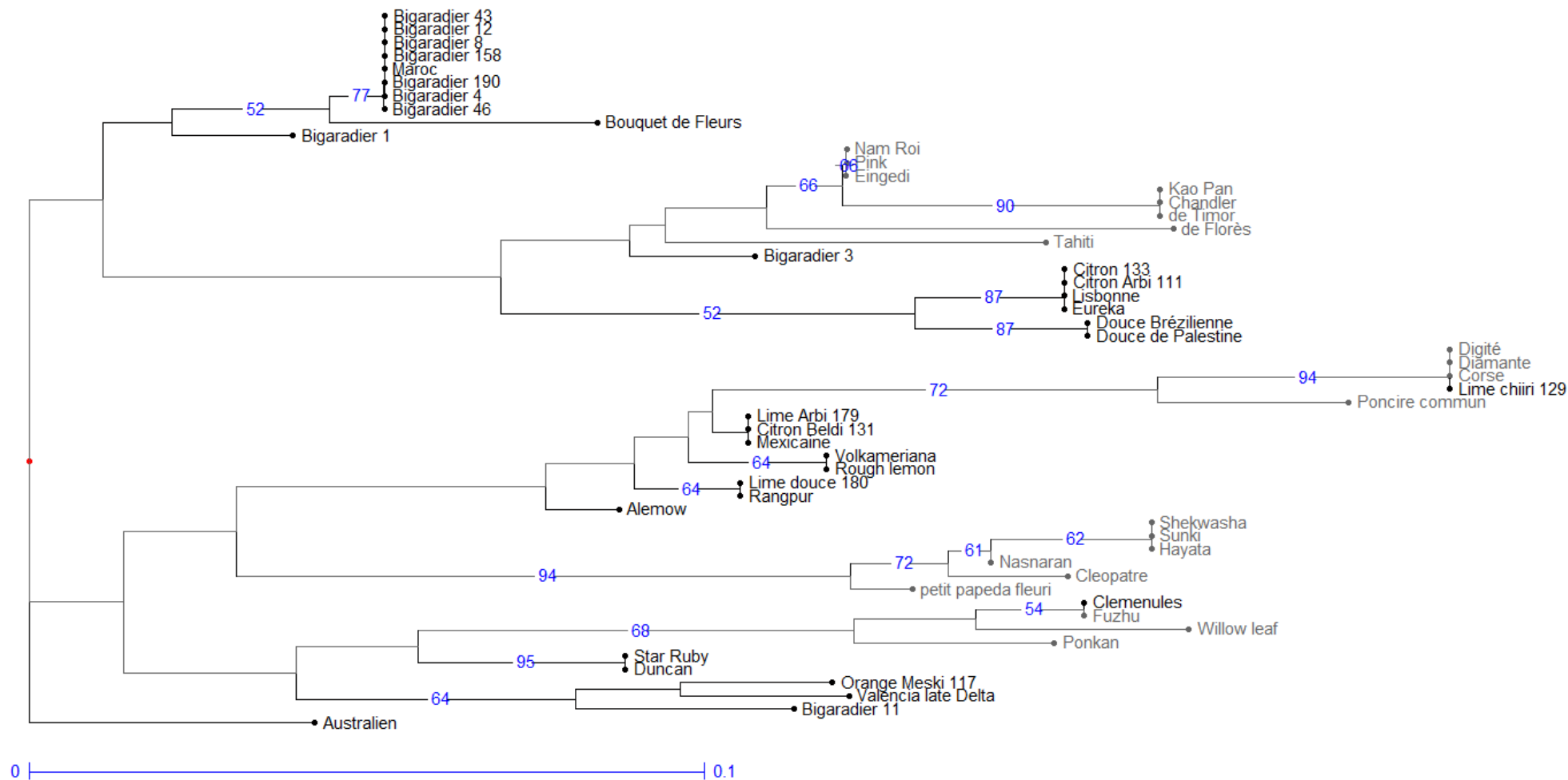


Figure 22e. Arbre Neighbor-joining avec les 21 marqueurs SNPs issus du gène *Nrt1a* chez les espèces d'agrumes ancestrales et leurs hybrides (1000 bootstraps réalisés, seuls les supports des branches $\geq 50\%$ sont représentés). Les noms des espèces ancestrales sont mis en gris.

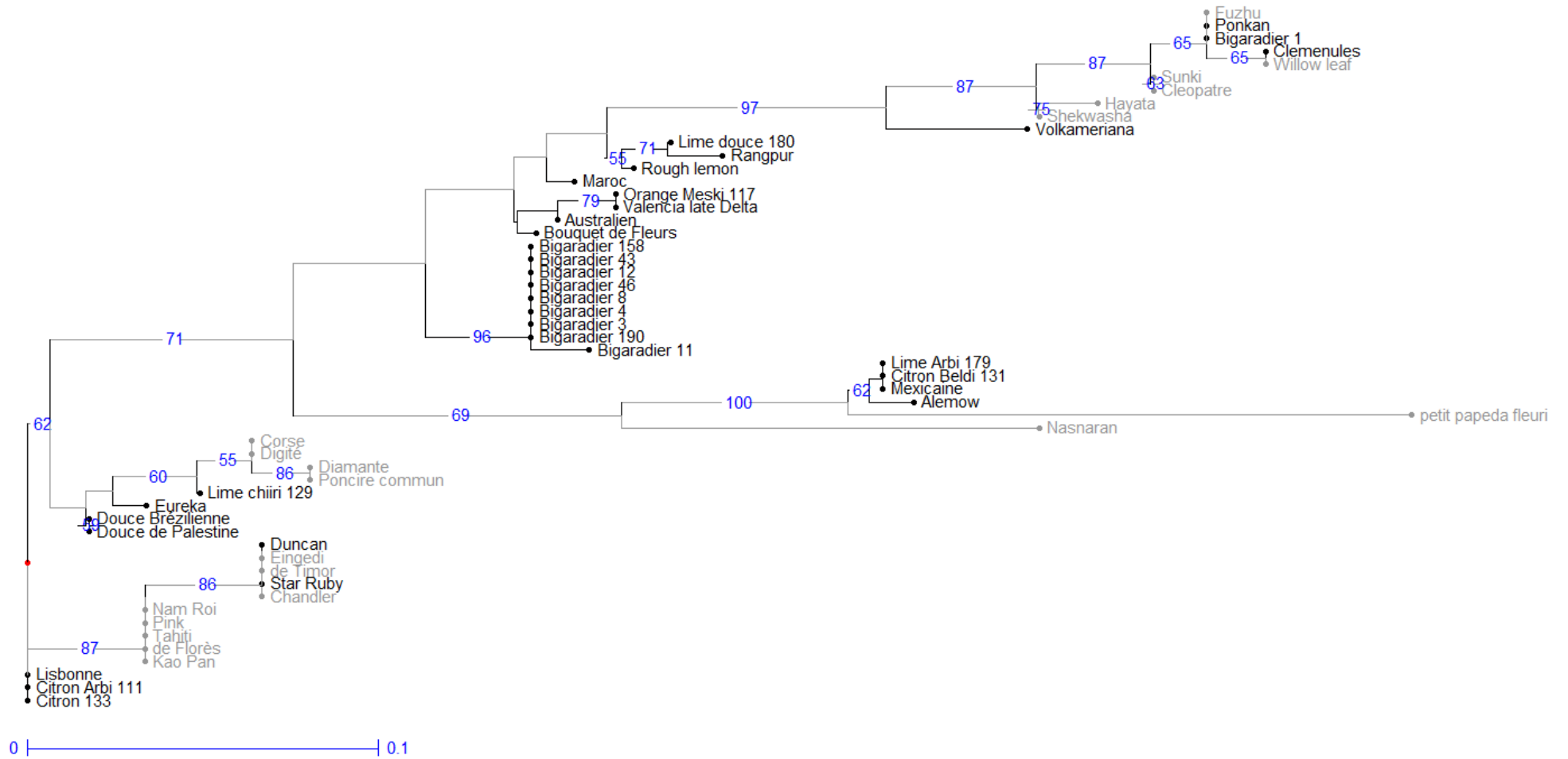


Figure 22f. Arbre Neighbor-joining avec les 30 marqueurs SNPs issus du gène *SosI* chez les espèces d'agrumes ancestrales et leurs hybrides (1000 bootstraps réalisés, seuls les supports des branches $\geq 50\%$ sont représentés). Les noms des espèces ancestrales sont mis en gris.

En complément à ces résultats, l'analyse en composantes principales des fréquences alléliques a été utilisée afin d'examiner le potentiel de contribution des espèces ancestrales à l'héritage des 6 gènes étudiés chez les espèces secondaires cultivées (Tableau 26). L'ACP a été effectuée sur XLSTAT® (Addinsoft, InstallShield Softawer Corporation, version 2012).

Une ACP globale basée sur l'ensemble des SNPs des 6 gènes a été effectuée. La matrice de départ est celle des fréquences alléliques des 54 génotypes pour les 242 allèles SNPs (121 loci polymorphes) relatifs aux 6 gènes en question. Ces fréquences étant des variables quantitatives initiales. Ces variables ont été transformées (centrées et normées). Ainsi il en résulte des variables non corrélées entre elles appelées composantes principales. La première composante (axe1) maximise la variation entre les groupes tandis que la deuxième (axe2) maximise la variation restante et ainsi de suite. Les trois premiers axes ont été retenus pour analyser les relations entre les espèces secondaires et les taxons de base, ils représentent 74.1% de l'inertie totale. L'axe 1 de l'ACP englobe 31.013% de la variation. Cet axe est principalement défini par les marqueurs des gènes *Sos1* et *Nrt1a*. L'axe 2 de l'ACP représente 25.197% de la variation et est influencé par les marqueurs de *Sos1* et le reste des marqueurs sauf *Nrt1a*. L'axe 3 représente 17.9% de la variation il est principalement défini par les marqueurs des gènes *Nrt1a*, *Aoc*, *Ts* et *Sos1*.

Le nuage de points est représenté sur 3 plans factoriels définis par les axes factoriels retenus (1/2/3), plan1 (axe1/axe2 explique 56.21% de la variation) (Figure 23a), plan2 (axe1/axe3 explique 48.9% de la variation) (Figure 23b) et plan3 (axe2/axe3 explique 43.08% de la variation) (Figure 23c).

Des ellipses de confiance ont été définies pour les taxons de base. Les accessions de chaque taxon de base apparaissent regroupées. Par ailleurs, le génotype de *C. micrantha* s'est complètement démarqué de tous les génotypes étudiés. De cette analyse, il apparaît clairement que les taxons de base des espèces d'agrumes sont très nettement différenciés. Les espèces secondaires y compris les accessions Tunisiennes sont positionnées entre leurs pools de gènes parentaux putatifs: *C. sinensis* est entre *C. maxima* et *C. reticulata*, *C. paradisi* est entre *C. sinensis* et *C. maxima*, *C. limon* est entre *C. aurantium* et *C. medica* et *C. aurantifolia* est entre *C. medica* et *C. micrantha* (Figure 23 b et c).

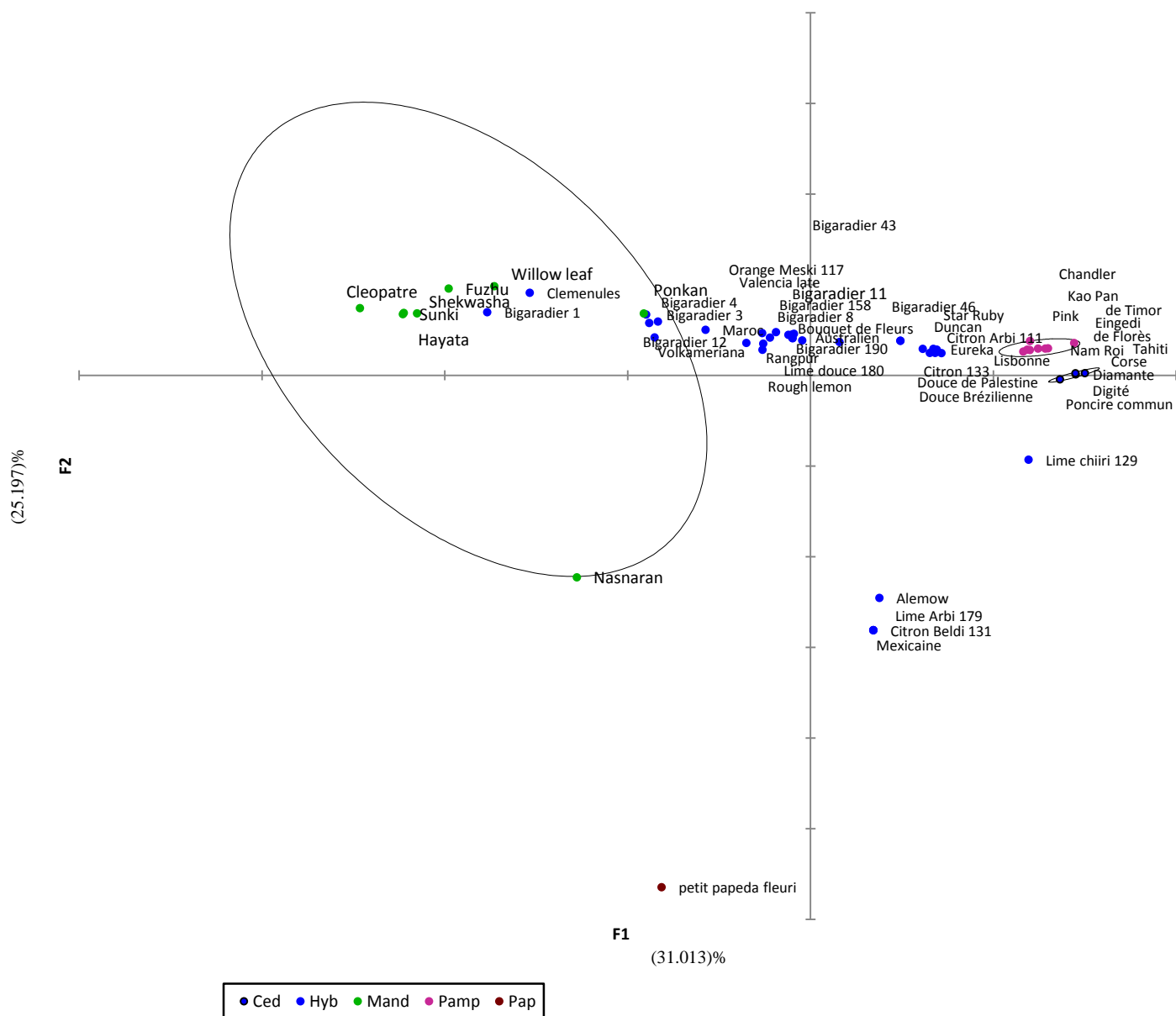


Figure 23a. Analyse en composantes principales de l'organisation génétique des espèces secondaires (Hyb) par rapport aux taxons ancestraux utilisés comme individus actifs pour définir les axes principaux (ced: Cédrat, Mand: Mandarinier, Pamp: pamplemousse, Pap: Papeda) pour l'ensemble des gènes candidats étudiés, selon le 1^{er} plan factoriel, axe1(F1)/axe2(F2), expliquant 56.21% de la variation.

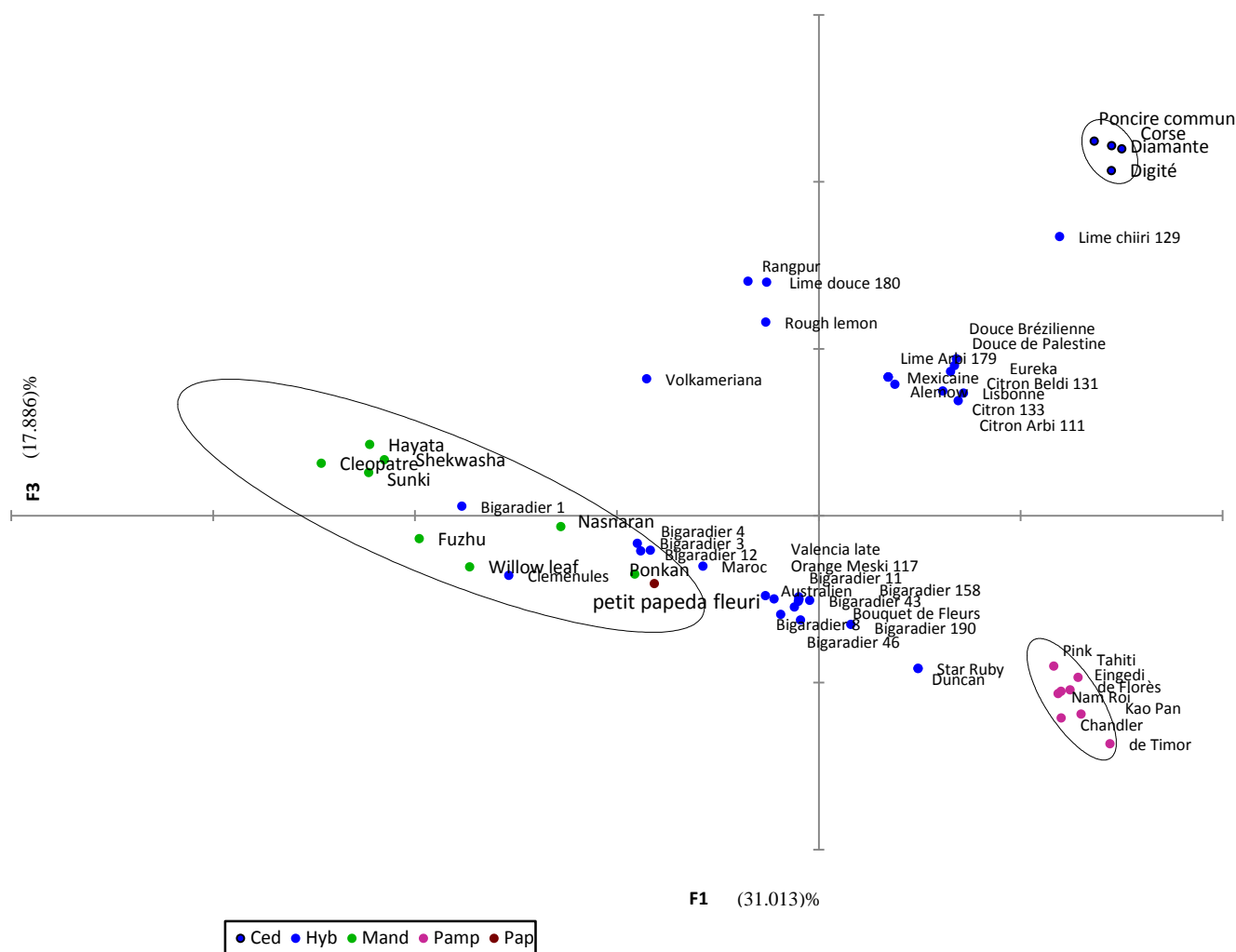


Figure 23b. Analyse en composantes principales de l'organisation génétique des espèces secondaires (Hyb) par rapport aux taxons ancestraux comme accessions actives (ced: Cédrat, Mand: Mandarinier, Pamp: pamplemousse, Pap: Papeda), pour l'ensemble des gènes candidats étudiés, selon le 2^{ème} plan factoriel, axe1(F1)/axe3(F3), expliquant 48.9% de la variation.

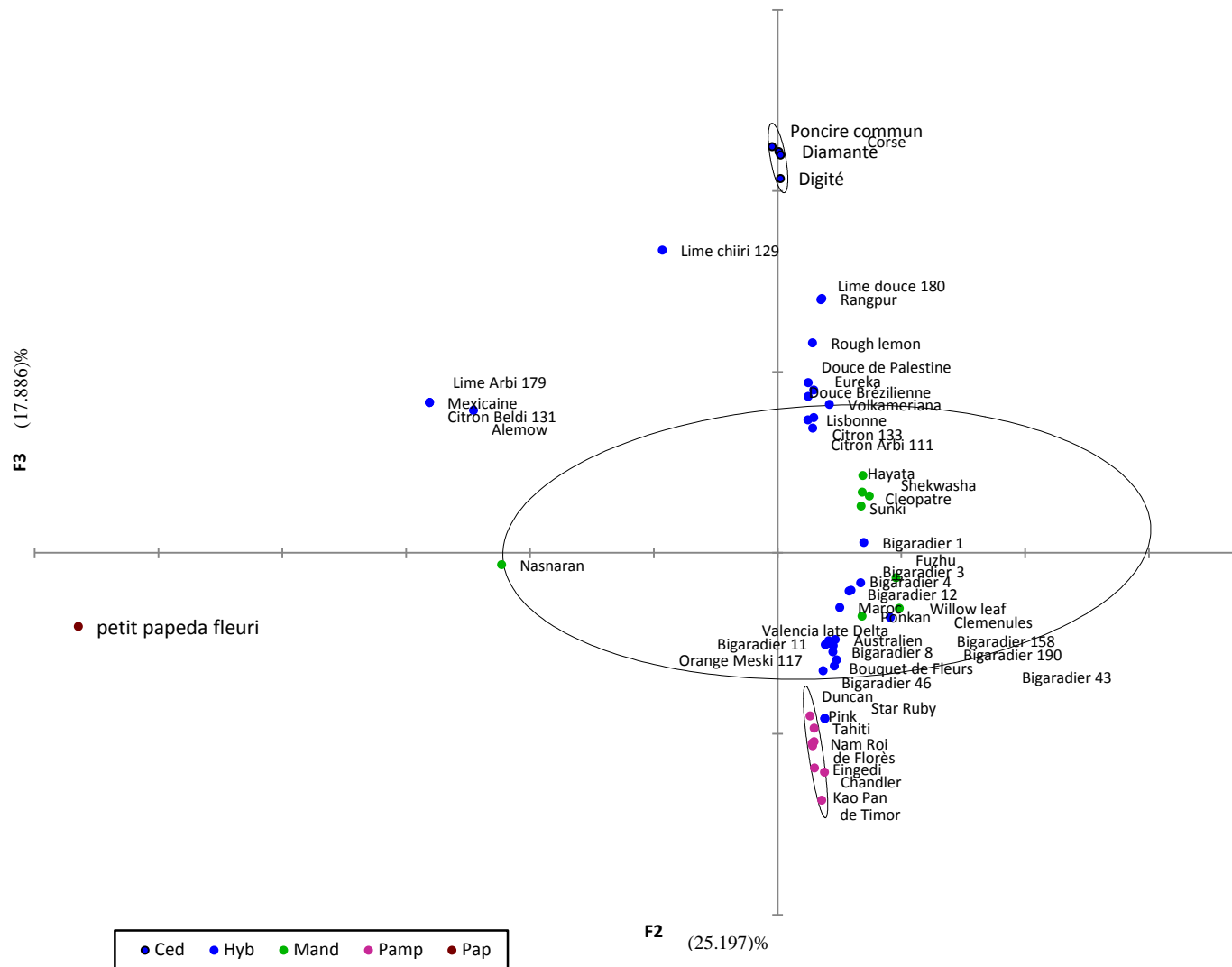


Figure 23c. Analyse en composantes principales de l'organisation génétique des espèces secondaires (Hyb) par rapport aux taxons ancestraux comme accessions actives (ced: Cédrat, Mand: Mandarinier, Pamp: pamplemousse, Pap: Papeda), pour l'ensemble des gènes candidats étudiés, selon le 3^{ème} plan factoriel, axe2(F2)/axe3(F3), expliquant 43.08% de la variation.

Dans un but de réaliser une analyse gène à gène de l'héritage phylogénétique chez les espèces secondaires, on a accompli des ACP pour chaque gène mettant en œuvre les taxons de base des espèces cultivées comme individus actifs, et en ayant projeté les génotypes des espèces secondaires sur les axes prédéfinis. L'héritage phylogénétique a été déduit à partir de la position intermédiaire des espèces secondaires relatives aux espèces ancestrales sur l'ACP, ainsi que l'analyse des configurations des mutations (SNPs) alléliques pour chaque locus. On a choisi de présenter les structures génétiques des loci *Nrt1a* et *Sos1* (Figure 24 a et b respectivement) comme exemples de répartition phylogénétique. Pour éviter l'encombrement des figures et pour une meilleure visualisation des ACP, seuls les génotypes uniques identifiés suite aux analyses NJ gène à gène, ont été considérés. Tous les pomélos, les orangers, et la majorité des bigaradiers (de référence et Tunisiens) sont positionnés de manière intermédiaire entre les groupes de *C. reticulata* (mandarinier, Mand) et *C. maxima* (pamplemoussier, Pamp). Il a donc été supposé que ces espèces avaient hérité pour chaque gène un allèle de chacun de ces groupes ancestraux parentaux (hétérozygotie interspécifique mandarine/pamplemousse; MP) (Tableau 26). Ceci a été confirmé en examinant la configuration allélique à chaque locus SNP. Cependant, deux génotypes de bigaradier se sont distingués: le bigaradier Tunisien 3 ayant hérité ses deux allèles du gène *Nrt1a* de *C. maxima* (homozygote pamplemoussier PP) et le bigaradier Tunisien 1 ayant hérité ses deux allèles du gène *Sos1* de *C. reticulata* (homozygote mandarinier MM). Aussi bien l'analyse NJ (Figure 22e et 22f, respectivement) que l'ACP (Figure 24a et b, respectivement) ont confirmé ces résultats. En ayant utilisé la même approche, les citronniers de référence (Eureka et Lisbonne) et Tunisiens (Citronnier Arbi 111 et citronnier 133) représenté par le MLG citron A, semblent être hétérozygotes cédratier/pamplemoussier (CP) pour les deux gènes. Le Rough lemon, apparaît hétérozygote CM, tandis que le volkameriana est hétérozygote CM pour le gène *Nrt1a* et homozygote MM pour le gène *Sos1*. En ce qui concerne les limes, toujours placées très proches de la lime mexicaine, le citronnier Beldi 131 (qui est en réalité une lime) et la lime Arbi 179 sont les seules limes à partager le profil de la lime mexicaine (représentés par le MLG lime M), hétérozygote interspécifique (C Pap) pour les allèles *C. medica* (C) et *C. micrantha* (Pap). La lime Rangpur et la lime douce Tunisienne 180 partagent le même profil (CM) pour les deux gènes étudiés. Les limes de référence, douce du Brésil et douce de Palestine (représentées par le MLG lime douce A) ont montré un profil (CP) pour les deux gènes. La lime Tunisienne Chiiri 129 semble avoir hérité ses deux allèles du cédrat (CC) pour chacun des gènes *Nrt1a* et *Sos1*. Les pomélos sont hétérozygotes (MP) pour le gène *Nrt1a* et

homozygotes (PP) pour *Sos1*, représentés dans ce dernier cas par le MLG pamplemousse C. Alemow (*C. macrophylla*) est révélé hétérozygote interspécifique (C Pap).

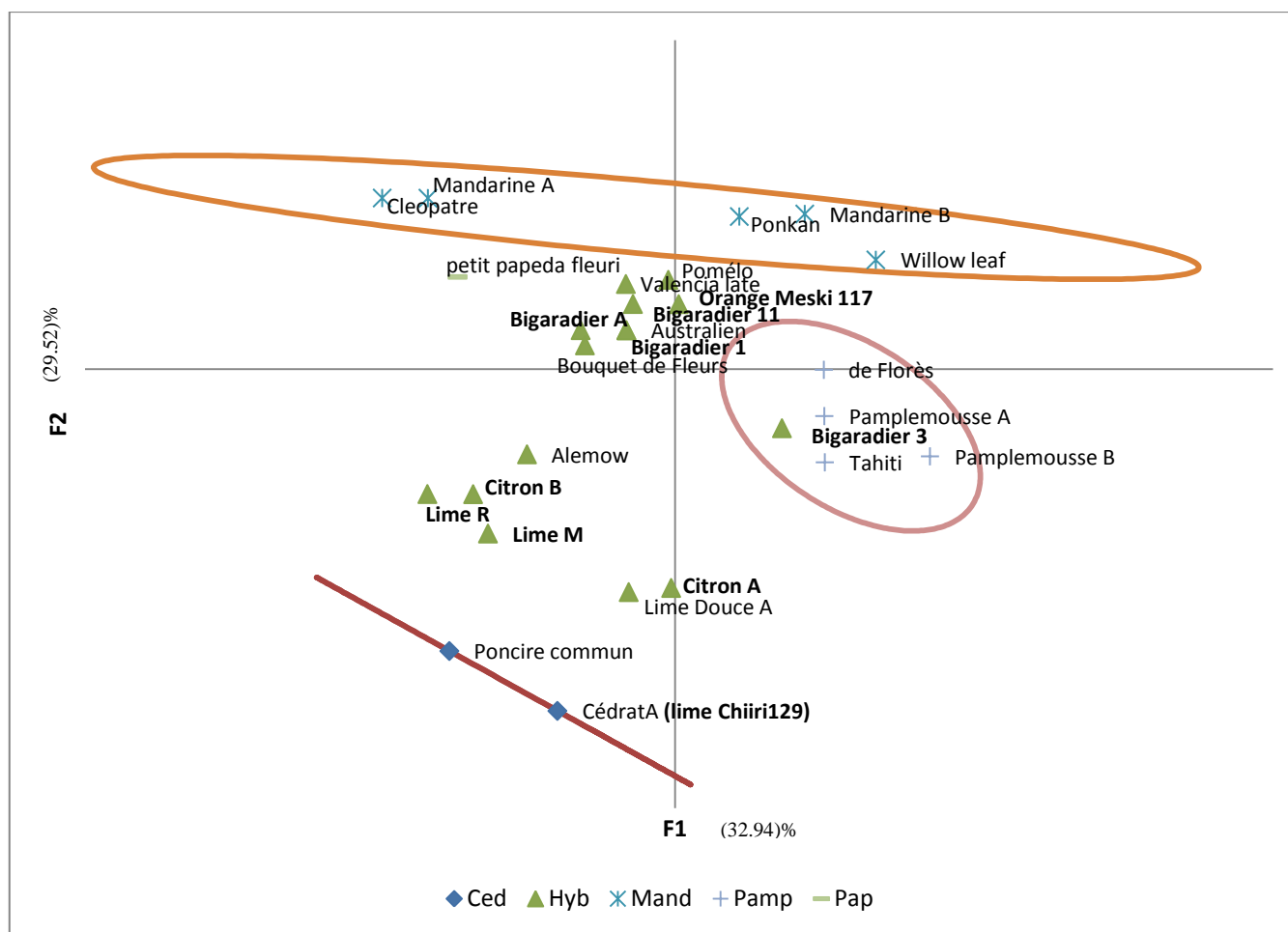


Figure 24a. Analyse en composantes principales de l'organisation génétique des espèces secondaires (Hyb) par rapport aux taxons ancestraux comme accessions actives (ced: CédraT, Mand: Mandarinier, Pamp: pamplemousse, Pap: Papeda), pour le gène candidat *Nrt1a*, selon le plan factoriel, axe1(F1)/axe2(F2), expliquant 62.46% de la variation. Les génotypes représentatifs des MLGs issus de l'analyse NJ pour le gène *Nrt1a* sont: MandarinierA (Shekwasha, Sunki, Hayata); Mandarin B (Clemenules et Fuzhu); Pamplemousse A (Nam Roi, Pink, Eingedi); Pamplemousse B (Kao Pan, Chandler, de Timor); CédraT A (Digité, Diamante, Corse, lime Chiiri129); Bigaradier A (Maroc, bigaradiers Tunisiens 4,8,12,43,46,158,190); Citron A (Eureka, Lisbonne, citrons Tunisiens 133 et 111); Citron B (Volkameriana et Rough lemon); Lime Douce A (douce Brésilienne, douce de Palestine); Lime M (Mexicaine et limes Tunisiennes 179 et 131); Lime R (Rangpur et lime Tunisienne 180); Pomélo (Star Ruby, Duncan).

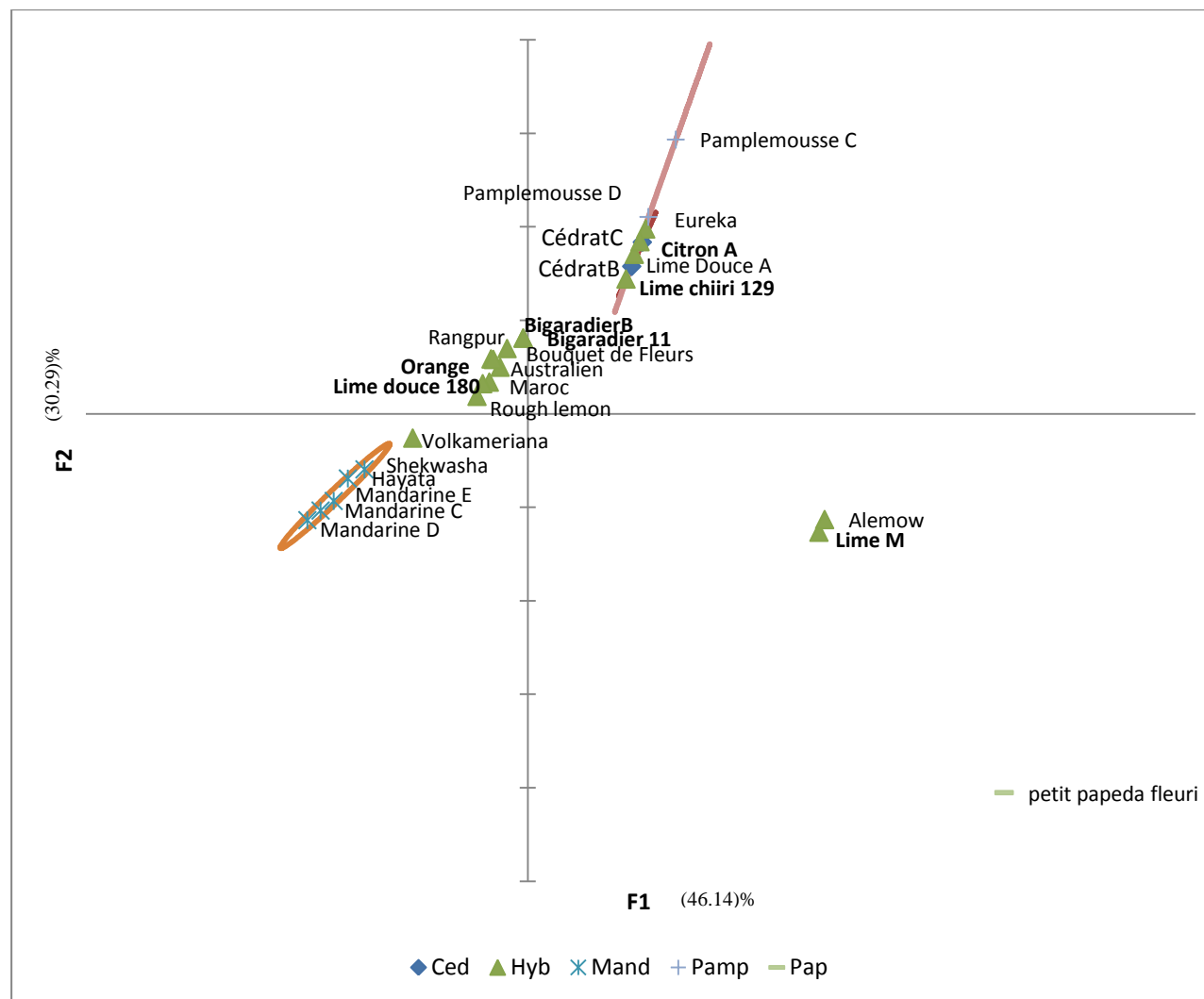


Figure 24b. Analyse en composantes principales de l'organisation génétique des espèces secondaires (Hyb) par rapport aux taxons ancestraux comme accessions actives (ced: Cédrat, Mand: Mandarinier, Pamp: pamplemousse, Pap: Papeda), pour le gène candidat *Sos1*, selon le plan factoriel, axe1(F1)/axe2(F2), expliquant 76.43% de la variation. Les génotypes représentatifs des MLGs issus de l'analyse NJ pour le gène *Sos1* sont: Mandarine C(Fuzhu, Ponkan, Bigaradier Tunisien 1); Mandarine D (Clemenules, Willow leaf); Mandarine E (Sunki, Cléopâtre); Pamplemousse C (Eingedi, Chandler, de Timor, pomélos Duncan et Star Ruby); Pamplemousse D (Kao Pan, Nam Roi, Pink, Tahiti, De Florès); Cédrat B (Digité, Corse); Cédrat C (Diamante, Poncire commun); Bigaradier B (bigaradiers Tunisiens 3,4,8,12,43,46,158,190); Orange (Orange Meski117, Orange Valencia); Citron A (Lisbonne, citrons Tunisiens 111 et 133); Lime Douce A (douce Brésilienne, douce de Palestine); Lime M (Mexicaine, limes Tunisiennes 179 et 131).

La même analyse a été réalisée pour les six gènes (tableau 26). Pour l'ensemble des génotypes, la contribution estimée de *C. reticulata* identique à celle de *C. maxima* était égale à 35.38%, celle de *C. medica* égale à 22.8% et enfin la contribution de Papeda était de l'ordre de 6.39%.

Les bigaradiers de référence (*C. aurantium*) semblent contenir plus d'allèles *C. maxima* (62.5%, 15/24) que de *C. reticulata* (37.5%, 9/24). Ils ont hérité 2 allèles de *C. maxima* (PP) pour 2 gènes (*Aoc* et *Lapx*) et étaient hétérozygotes interspécifiques des deux pools géniques (MP) pour la majorité des gènes étudiés. Pour les bigaradiers Tunisiens 1 et 3, trois gènes sur 6 étaient hérités uniquement de *C. reticulata* (MM). Trois et 2 gènes étaient hérités en hétérozygotie de *C. maxima* et de *C. reticulata*, respectivement pour les bigaradiers 1 et 3.

Les bigaradiers 4 et 12 ont hérités équitablement des deux pools géniques de *C. maxima* (50%) et de *C. reticulata* (50%) en étant hétérozygotes (MP) pour la majorité des gènes, mais en étant homozygotes *C. reticulata* (MM) pour le gène *Aoc* et homozygotes *C. maxima* (PP) pour le gène *Lapx*. Le restant des bigaradiers Tunisiens ont plus hérité du pool génique de *C. maxima* que de celui de *C. reticulata*. Les contributions des lignées parentales étaient, ainsi égales à 66.20% pour *C. maxima* et 33.80% pour *C. reticulata*.

Pour le gène *Lapx*, le bigaradier Tunisien 46 a présenté un assortiment allélique homozygote impliquant pour la plupart des loci des allèles pamplemousse.

C. sinensis était représenté par le génotype Valencia Late et l'oranger Meski Tunisien 117 pour lesquels les conclusions sont identiques pour tous les gènes. Les deux orangers sont hétérozygotes interspécifiques (MP) pour 5 gènes sur 6 et homozygotes (PP) au gène *Ccc* pour des allèles de *C. maxima*. Pour cette espèce, les contributions de *C. maxima* et *C. reticulata* sont de 58.33% et 41.67%, respectivement.

Les citronniers de référence (Lisbonne et Eureka) et les deux citronniers Tunisiens (Arbi 111 et Citronnier 133) ont montré les mêmes profils phylogénétiques hétérozygotes pour les 6 gènes avec la présence systématique d'un allèle de cédrat. Trois gènes sont hétérozygotes (CP) et les 3 autres (CM). La contribution de *C. medica* (50%) était pour tous les gènes, le double de celle de chacun des taxons *C. maxima* (25%) et *C. reticulata* (25%).

Pour les différents génotypes de *C. aurantifolia*, *C. medica* apparaît comme parent pour tous les gènes. Ainsi, la contribution du pool génique *C. medica* relatif à cette espèce est de l'ordre de 54.17%. Le reste des contributions sont partagées entre *C. reticulata* (12.5%), *C. maxima* (6.25%) et *C. micrantha* (27.08%) suivants les génotypes.

Pour tous les gènes, la lime mexicaine, le citronnier Beldi 131 (lime), la lime Arbi 179 et le *C. macrophylla* ont montré une hétérozygotie interspécifique entre *C. medica* et *C. micrantha*.

La lime Chiiri est homozygote pour les allèles cédrat (CC) pour 4 gènes sur 6 et hétérozygote C Pap pour les 2 gènes restants. De ce fait, la contribution de la lignée parentale *C. medica* pour ce génotype est égale à 83.35%, alors que celle de *C. micrantha* n'est que 16.67%. Par ailleurs, on a noté une diversité particulière de la lime douce Tunisienne 180 qui est hétérozygote CM pour tous les gènes alors que les autres limes douces de référence sont (3CM, 3CP). Ce profil de la lime douce tunisienne est similaire à ceux de la lime Rangpur et de Rough lemon. Les pomélos ont 2 gènes hérités uniquement de *C. maxima* (*Ccc* et *Sos1*), alors que les 4 gènes restants étaient hérités de façon hétérozygote à partir de *C. reticulata* et *C. maxima* avec des contributions respectives de 33.35% et 66.67%.

Tableau 26. Origines phylogénétiques des gènes chez les espèces secondaires et les hybrides des agrumes

Génotype	<i>Aoc</i>		<i>Lapx</i>		<i>Ccc1</i>		<i>Ts</i>		<i>Nrt1a</i>		<i>Sos1</i>	
Mandarinier Nasnaran	M	PAP	M	PAP	PAP	PAP	M	PAP	M	PAP	M	PAP
Clémentine	M	M	M	M	M	P	M	M	M	M	M	M
Bigaradier Maroc	M	P	P	P	M	P	M	P	M	P	M	P
Bigaradier bouquet de fleurs	P	P	P	P	M	P	M	P	M	P	M	P
Bigaradier Australien	P	P	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P
Bigaradier Tun 1	M	M	M	M	M	P	M	P	M	P	M	M
Bigaradier Tun 3	M	M	M	M	M	P	M	M	P	P	M	P
Bigaradier Tun 4	M	M	P	P	M	P	M	P	M	P	M	P
Bigaradier Tun 8	P	P	P	P	M	P	M	P	M	P	M	P
Bigaradier Tun 11	M	P	P	P	P	P	M	P	M	P	M	P
Bigaradier Tun 12	M	M	P	P	M	P	M	P	M	P	M	P
Bigaradier Tun 43	P	P	P	P	M	P	M	P	M	P	M	P
Bigaradier Tun 46	P	P	?	P	M	P	M	P	M	P	M	P
Bigaradier Tun 158	P	P	P	P	M	P	M	P	M	P	M	P
Bigaradier Tun 190	P	P	P	P	M	P	M	P	M	P	M	P
Oranger Valencia late	M	P	M	P	P	P	M	P	M	P	M	P
Oranger Meski Tun 117	M	P	M	P	P	P	M	P	M	P	M	P
Citronnier Eureka	C	P	C	M	C	M	C	M	C	P	C	P
Citronnier Lisbonne	C	P	C	M	C	M	C	M	C	P	C	P
Rough lemon	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M
Volkameriana	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	M	M
Citronnier Arbi Tun 111	C	P	C	M	C	M	C	M	C	P	C	P

Génotype	<i>Aoc</i>		<i>Lapx</i>		<i>Ccc1</i>		<i>Ts</i>		<i>Nrt1a</i>		<i>Sos1</i>	
Citronnier Tun 133	C	P	C	M	C	M	C	M	C	P	C	P
Limettier Rangpur	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M
Limettier Mexicaine	C	PAP	C	PAP	C	PAP	C	PAP	C	PAP	C	PAP
Limettier douce de Palestine	C	M	C	M	C	P	C	M	C	P	C	P
Limettier douce Brezilienne	C	M	C	M	C	P	C	M	C	P	C	P
Limettier Chiiri Tun 129	C	C	C	PAP	C	C	C	PAP	C	C	C	C
Citronnier Beldi Tun 131	C	PAP	C	PAP	C	PAP	C	PAP	C	PAP	C	PAP
Limettier Arbi Tun 179	C	PAP	C	PAP	C	PAP	C	PAP	C	PAP	C	PAP
Limettier douce Tun 180	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M
Pomélo Duncan	M	P	M	P	P	P	M	P	M	P	P	P
Pomélo Star Ruby	M	P	M	P	P	P	M	P	M	P	P	P
Alemow	C	PAP	C	PAP	C	PAP	C	PAP	C	PAP	C	PAP

(M) Mandarinier, (P) pamplemoussier, (C) cédratier, (PAP) Papeda

IV- Discussion

4-1- Découverte des marqueurs SNPs, degrés et profils de polymorphisme nucléotidique et utilité des SNPs dans l'analyse de la diversité et des études phylogénétiques du genre *Citrus*

Les agrumes, dotés d'un nombre de chromosomes basique égal à 9, possèdent une taille relativement petite du génome (372 Mb pour le génome haploïde de *C. sinensis*), ce qui fait des agrumes un modèle intéressant pour les génomiques des arbres fruitiers ligneux (Ollitrault et Navarro, 2012). L'exploitation des données de séquences nucléotidiques obtenues à partir de gènes exprimés révèle divers types de polymorphisme très utiles pour le développement de marqueurs moléculaires et leur utilisation dans diverses applications (Gmitter Jr. *et al.*, 2012). Les marqueurs SSRs ont été les premiers marqueurs PCR co-dominants développés sur agrumes. Seul un nombre limité de ces marqueurs a été publié (Kijas *et al.*, 1995; Corazzan Nunes *et al.*, 2002; Barkley *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006; Novelli *et al.*, 2006; Terol *et al.*, 2007; Froelicher *et al.*, 2008; Luro *et al.*, 2008; Ollitrault *et al.*, 2010), et utilisé pour la cartographie génétique (Luro *et al.*, 2007; Bernet *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2008; Terol *et al.*, 2008; Ollitrault *et al.*, 2010) et l'étude de la diversité génétique (Barkley *et al.*, 2006; Garcia-Lor *et al.*, 2012). Plus récemment, plusieurs études ont permis de développer et d'appliquer un éventail étendu de marqueurs SNPs (Close *et al.*, 2006; Ollitrault *et al.*, 2012a) à des fins de génotypage d'accessions d'agrumes (Novelli *et al.*, 2004; Omura *et al.*, 2008) et d'analyse de la phylogénie des agrumes (Garcia-Lor *et al.*, 2013). L'exploitation de méthodes de séquençage à haut débit ouvre des perspectives très prometteuses pour des études de QTLs, de génétique d'association ou pour le clonage positionnel des gènes (Gmitter Jr. *et al.*, 2012). En effet, leur répartition sur l'ensemble du génome, l'homoplasie peu fréquente et leur adaptation aux systèmes de détection haut débit, ont fait que les SNPs sont rapidement devenus les marqueurs de choix pour les études sur les caractères complexes.

Pour cette partie de la thèse, nous avons choisi de séquencer directement les produits PCR relatifs aux 6 gènes candidats de tolérance à la salinité, afin d'identifier et d'analyser les SNPs chez les espèces d'agrumes.

Cette méthode a fait ses preuves (Garcia-Lor *et al.*, 2013) et l'absence de clonage pour séquencer les 2 allèles simplifie grandement les procédures et réduit considérablement les coûts, ce qui est indispensable pour analyser plusieurs dizaines de génotypes. Nous avons confirmé que la détection de SNPs valides était possible par le séquençage de plus de 4 kb

amplifiés à partir de 6 gènes pour 54 génotypes fortement hétérozygotes. Après nettoyage et alignement des séquences issues du séquençage des amplicons relatifs aux 54 génotypes du genre *Citrus*, un total de 3305 pb de données de séquences alignées a été retenu. Nous avons observé une très grande conservation des séquences entre les différentes espèces avec seulement 2 indel identifiés. Ces gènes candidats ont révélé 121 SNPs, correspondant à 37 SNPs par kb. Une étude a montré que le nombre de SNPs identifié chez *Poncirus trifoliata* (un genre apparenté aux agrumes) est en moyenne de 1 SNP tous les 64 pb (Novelli *et al.*, 2004). Le séquençage de 121 gènes candidats pour la tolérance au froid a généré un total de 59.173 pb de données de séquences alignées. A partir de ces séquences, Eckert *et al.* (2009) ont détecté 933 SNPs chez l'arbre forestier *Pseudotsuga menziesii* (Sapin de Douglas). Chez un autre conifère, le pin à l'encens (*Pinus taeda* L.), un total de 288 SNPs ont été détectés à travers 19 gènes sur une longueur des séquences alignées de 18.027 pb (Brown *et al.*, 2004). A l'échelle du génome, Schmid *et al.* (2003) ont identifié et caractérisé un total de 8051 SNPs à partir de 10.706 ESTs générés de banques cDNA dérivant de 6 accessions différentes d'*Arabidopsis thaliana*. Le nombre de SNPs identifiés chez les 6 accessions d'ESTs analysées, variait entre 1 SNP/240 pb et 1 SNP/386 pb.

Pour les génotypes représentant les taxons ancestraux des agrumes, le nombre moyen de SNPs par kb dans les régions non codantes est près de 2 fois plus élevé que celui obtenu dans les régions codantes. La même valeur a été trouvée par une autre étude récente ayant impliqué plus de genres voisins des agrumes (Garcia-Lor *et al.*, 2013). Cette valeur est élevée à comparer avec la valeur de 1.5 fois supérieure obtenue pour les espèces d'*Eucalyptus* (Külheim *et al.*, 2009).

La fréquence moyenne des SNPs/kb trouvés dans les exons était de 25.6 pour les espèces du genre *Citrus*, cette valeur est proche de celle trouvée par une autre étude portant sur le même genre (28.96 SNPs/kb) (Garcia-Lor *et al.*, 2013); mais elle est supérieure à celles obtenues chez les autres espèces comme *Eucalyptus grandis* avec 5 SNPs/kb (Novaes *et al.*, 2008), *Populus tremula* avec 16.7 SNP/kb (Ingvarsson, 2005), et chez le maïs avec 23.25 SNPs/kb (Yamasaki *et al.*, 2005). Cependant, cette valeur de la fréquence moyenne est inférieure à celles estimées chez *Quercus crispula*, avec 40 SNPs/kb (Quang *et al.*, 2008) et *Eucalyptus camaldulensis*, avec 47.62 SNPs/kb (Külheim *et al.*, 2009). Ces taux de découverte de SNPs apparaissent faibles à comparer aux rapports précédents de 1 SNP chaque ~ 100 pb dans les régions codantes chez *Eucalyptus* (Kirst *et al.*, 2005) et autres espèces forestières (Brown *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2006).

Chez l'arbre forestier *Pseudotsuga menziesii* (Sapin de Douglas), la majorité des SNPs étaient silencieux ($n=732/933$), avec 478 d'entre eux localisés dans les régions non codantes (Eckert *et al.*, 2009).

Les pourcentages des évènements de transition et de transversion sont en accord avec les résultats obtenus chez les mêmes espèces du genre *Citrus* (Novelli *et al.*, 2004; Terol *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 2010; Garcia-Lor *et al.*, 2013), ou chez d'autres espèces, comme le palmier à huile (Riju *et al.*, 2007). Par contre, chez le peuplier, la fraction relative aux transitions était relativement élevée (70%; Tuskan *et al.*, 2006).

Pour tous les gènes analysés, 46 des SNPs identifiés ($46.46\% = 46/99$) chez tous les génotypes d'espèces ancestrales étaient spécifiquement polymorphes. Ce nombre s'élève à 99 loci SNPs polymorphes en considérant tous les taxons de base ensemble (SNPs non spécifiques à chaque espèce). Pour les espèces secondaires, globalement le nombre de loci SNPs polymorphes par espèce est largement plus élevé que chez les taxons ancestraux.

La valeur de la diversité nucléotidique moyenne observée chez les taxons ancestraux du genre *Citrus*, l'échantillon total ainsi que la population Tunisienne ($\pi= 0.009$), relativement élevée, est presque 1.4 fois inférieure aux valeurs observées sur un échantillon d'agrumes plus large incluant des représentants des genres *Poncirus*, *Fortunella*, *Eremocitrus* et *Microcitrus* dans une étude portant sur 27 gènes (Garcia-Lor *et al.*, 2013).

Cette différence pourrait être due à l'échantillonnage des gènes ainsi qu'aux proportions relatives d'exons et d'introns. Par ailleurs, la stratégie de séquençage peut bien causer un artefact. Les loci contenant des insertions et/ou délétions polymorphes ainsi que les loci SNPs nucléotidiques qui suivent, peuvent ne pas être pris en compte puisque les chromatogrammes deviennent illisibles une fois un site indel est atteint.

Il serait donc possible que ceci entraîne un biais contre les loci dotés de degrés de polymorphisme relativement élevé, si les polymorphismes nucléotidique et d'insertion/délétion sont positivement corrélés (Ingvarsson, 2008).

La diversité nucléotidique que nous avons observé chez les agrumes est également presque 1.8 fois supérieure aux valeurs observées chez, la vigne ($\pi= 0.005$; Lijavetzky *et al.*, 2007), 2 fois supérieure aux valeurs observées chez *Populus tremula* ($\pi= 0.0042$; Ingvarsson, 2008), et 1.5 fois supérieure à celle obtenue chez le maïs ($\pi= 0.006$; Ching *et al.*, 2002), et le seigle ($\pi= 0.006$; Li *et al.*, 2011). Alors que cette valeur est approximativement 9 fois supérieure à celles obtenues chez le soja ($\pi= 0.00097$; Zhu *et al.*, 2003) et chez l'homme ($\pi= 0.001$; Sachidanandam *et al.*, 2001). De très faibles degrés de polymorphisme ont été observés chez

Pinus sylvestris (0.0004-0.0014), *Eucalyptus grandis* (0.00186; Novaes *et al.*, 2008) et *Cryptomeria japonica* (0.0002-0.0038), des valeurs intermédiaires ont été observées chez *Pinus taeda* (0.0041), *Picea abies* (0.0031; Heuertz *et al.*, 2006), *Picea glauca* et *Picea mariana* (0.0066-0.0081). Tandis que d'autres espèces ligneuses ont montré de très forts niveaux de polymorphisme, comme *P. tabuliformis* (0.0107), *P. densata* (0.0101) et *Pseudotsuga menziesii* (0.0085) (Ma *et al.*, 2006).

Nos résultats ont par ailleurs des variations importantes du degré de polymorphisme entre les gènes comme cela a également été observé chez d'autres espèces d'arbres. D'importantes variations locus à locus relatives aux degrés de polymorphisme ont aussi été rapportées sur certains conifères (Brown *et al.*, 2004; Bouillé et Bousquet, 2005). Par conséquent, bien d'autres loci devraient être analysés pour obtenir une estimation pangénomique représentative du polymorphisme des agrumes.

Ces variations de π entre les fragments d'ADN séquencés soulignent les limites des comparaisons de la variation entre espèces quand les estimations de π sont basées sur seulement quelques loci (Brown *et al.*, 2004). Les régions de l'ADN intergénique (non codant), où les niveaux de variation devraient être plus élevés (Zwick *et al.*, 2000) sont susceptibles de fournir une image différente de la diversité chez les agrumes et les autres espèces. En effet, l'estimation moyenne de la diversité nucléotidique était la plus élevée avec les sites silencieux ($\pi_{\text{sil}} = 0.014$) et la moins élevée avec les sites non synonymes ($\pi_{\text{non-syn}} = 0.006$).

Au sein du genre *Citrus*, il apparaît clairement que les niveaux de diversité des trois taxons de base sont assez différents. *C. reticulata* et *C. medica* présentent respectivement la plus forte et la plus faible diversité. Toutefois, le ratio de diversité de Nei (He) de *C. maxima* sur celle de *C. reticulata* est plus élevé dans notre étude (0.051/0.116=0.44) que celui obtenu par Ollitrault *et al.* (2012a) (0.063/0.279=0.23) à partir d'un set de marqueurs SNPs en hétérozygotie chez le clémentinier. Cela confirme la conclusion d'Ollitrault *et al.* (2012a) selon laquelle le biais d'échantillonnage des loci SNPs lié à leur découverte dans le clémentinier entraîne une surestimation de la diversité de *C. reticulata* relativement aux autres taxons ancestraux.

L'analyse des degrés moyens de polymorphisme inter-accessions au sein et entre les taxons de base et leurs hybrides, a révélé des niveaux de différenciation importants entre les taxons ancestraux comparativement à la diversité intrataxon. Un résultat en accord avec celui obtenu par Garcia-Lor *et al.* (2013) sur un autre échantillon de ces mêmes taxons de base. Ainsi, la

différenciation entre *C. reticulata* et *C. maxima* est 2.7 fois supérieure à la diversité intra *C. reticulata* (10.33/3.86). De même pour les cédratiers et les Papedas, le ratio inter/intra est très élevé (de l'ordre de $26 = 12.37/0.48$), traduisant l'énorme écart entre la densité des SNPs chez les hybrides *C. medica* X *C. micrantha* et le polymorphisme au sein de *C. medica* (CC). Par conséquent, on peut dire que l'analyse de la densité des SNPs le long du génome pourrait très bien aider à différencier entre les régions génomiques issues d'hybridation interspécifique (MP ou C Pap par exemple), et celles résultant d'héritage intraspécifique (MM, PP ou CC par exemple) dans les génomes des espèces secondaires.

Cette forte différenciation entre les taxons de base a été confirmée par les valeurs de l'indice de fixation de Wright (Fw) et de l'indice de différenciation génétique (Fst) entre taxons. La différenciation inter-taxon (Fst) explique l'essentiel de la structuration globale (Fw), validant les subdivisions taxonomiques considérées et témoignant d'une limitation forte des flux de gènes entre ces pools géniques du genre *Citrus*. Un élément clef de cette limitation des flux de gènes entre groupes sexuellement totalement compatibles est une évolution allopatrique. En effet, l'aire de diversification de *C. medica* se situe entre le nord-est de l'Inde, le Bangladesh et la Birmanie, celle de *C. reticulata* du Nord de la Chine au Japon alors que *C. maxima* a une origine plus intertropicale (Malaisie, Philippines). Les marqueurs SNPs révélés à partir de notre échantillon interspécifique bien diversifié, ont confirmé que les mutations ponctuelles sont des outils efficaces pour la différenciation interspécifique, comme ça était démontré par Garcia-Lor *et al.* (2013) et Ollitrault *et al.* (2012 a,b). Cependant, ces SNPs semblent être, en moyenne, moins polymorphes pour dévoiler un polymorphisme intraspécifique potentiel. Cela n'empêche que lors de notre étude, qui a l'avantage d'inclure plusieurs génotypes pour chaque espèce d'agrumes, on a pu identifier certains loci SNPs particuliers qui reflètent une diversité intraspécifique.

4-2- Évolution des gènes chez les agrumes

La sélection naturelle agit sur les phénotypes, mais comme les phénotypes sont en partie déterminés par des génotypes, la sélection naturelle peut donc indirectement affecter la variation au niveau moléculaire. Les forces évolutives sont de différentes formes (directionnelle, balancée et purifiante). En interaction avec d'autres forces (telles que la dérive génétique, la migration, la recombinaison, etc...), ces diverses formes de sélection peuvent affecter différemment la distribution des fréquences alléliques, le spectre des fréquences des sites polymorphes le long des séquences, ou bien le déséquilibre de liaison (*DL*) entre sites

proches, ainsi que la diversité génétique intra groupes et la différenciation génétique entre les groupes (Eveno, 2008).

A ce jour, il y a encore peu d'études sur le polymorphisme et la divergence à travers plusieurs loci de gènes chez les agrumes (Novelli *et al.*, 2004; Garcia-Lor *et al.*, 2012, 2013; Ollitrault *et al.*, 2012a).

Chez les taxons ancestraux, le rapport moyen des taux de mutation non synonyme contre silencieuse par site ($\pi_{\text{nonsyn}}/\pi_{\text{sil}}$) était de 0.519, une valeur estimée relativement élevée par rapport à celle obtenue par Garcia-Lor *et al.* (2013) ($\pi_{\text{nonsyn}}/\pi_{\text{sil}} = 0.345$). Ces valeurs obtenues sur agrumes sont plus élevées que les valeurs 0.17 et 0.21 relatives aux taux observés chez l'épinette blanche (*Picea glauca*, Pavy *et al.*, 2006) et chez *A. thaliana* (Zhang *et al.*, 2002), respectivement. Les valeurs observées sur agrumes apparaissent d'autant plus élevées lorsqu'on les compare avec *Populus tremula*, où la majorité des gènes présentaient des rapports de polymorphisme de remplacement contre silencieux qui étaient considérablement inférieurs à l'unité ($\pi_{\text{nonsyn}}/\pi_{\text{sil}} = 0.083$) (Ingvarsson, 2008).

Ces valeurs relativement fortes pour les agrumes par rapport aux valeurs trouvées chez les autres espèces, indiquent que les gènes de ces derniers ont été soumis à des sélections positives probablement contraintes par des environnements différents.

L'évolution allopatrique des différents taxons de base, pourrait être un élément explicatif de cette diversification non synonyme sur certains gènes.

La valeur minimale de $\pi_{\text{nonsyn}}/\pi_{\text{sil}}$ dans l'échantillon étudié tout entier était de 0.1 au locus *Aoc*, tandis que la valeur maximale de ce rapport était de 1.36 au locus *Nrt1a*. De façon logique, pour les mêmes loci, le taux de substitution non synonyme variait de 0.00219 pour le locus *Aoc* à 0.0179 pour le locus *Nrt1a*, un résultat qui suggère l'implication de contraintes sélectives variant entre loci (Fu *et al.*, 2010).

L'analyse gène à gène a permis de réaliser le test de neutralité des gènes candidats pour les trois groupes d'agrumes en question (groupes ancestraux, population totale et population Tunisienne). Pour les taxons de base et l'échantillon total, quatre gènes ont montré des rapports $\pi_{\text{nonsyn}}/\pi_{\text{syn}}$ inférieurs à 1 ($n=4$). Mis à part trois exceptions citées plus loin, nos résultats sur le polymorphisme intraspécifique traduisent l'action de sélection purifiante à tous les gènes étudiés qui sont, par conséquent, fortement contraints. Un résultat conforme aux estimations de $\pi_{\text{nonsyn}}/\pi_{\text{syn}}$ trouvées chez *Populus tremula* et *P. trichocarpa* (Ingvarsson, 2007, 2008).

Les rapports $\pi_{\text{nonsyn}}/\pi_{\text{syn}}$ aux deux loci *Nrt1a* et *Sos1* étaient supérieurs à 1 chez la population ancestrale (1.84 et 1.19 respectivement) ainsi que pour l'échantillon total (1.30 pour les deux loci). Chez *Pseudotsuga menziesii*, 6 gènes sur 115 gènes candidats pour la tolérance au froid avaient un rapport $\pi_{\text{nonsyn}}/\pi_{\text{syn}}$ supérieur à 1 avec des valeurs allant de 1.13 à 3.09 (Eckert *et al.*, 2009). Chez *Pinus densata* 1 gène analysé sur 7 avait des valeurs de ce rapport supérieures à 1 (Ma *et al.*, 2006). À l'échelle intraspécifique, ce taux a fait trois exceptions: il était proche de 1 pour *C. maxima* avec le locus *Ccc* (0.83), pour *C. reticulata* avec le locus *Nrt1a* (0.72), et a eu la plus forte valeur pour *C. reticulata* avec le locus *Sos1* (0.96). Il est clair que les deux gènes *Nrt1a* et *Sos1* sont sous sélection positive (directionnelle) qui a entraîné l'augmentation en fréquence d'allèle(s) (soit une mutation au niveau d'un site nucléotidique ou bien une combinaison particulière de ces sites polymorphes le long d'une séquence d'ADN) lui conférant un avantage sélectif, jusqu'à sa fixation.

De façon intéressante, ces trois gènes d'intérêt *Ccc* (Colmenero-Flores *et al.*, 2007); *Nrt1a* (Brumós *et al.*, 2009); et *Sos1* (Shi *et al.*, 2002; Olías *et al.*, 2009; Quintero *et al.*, 2011) sont potentiellement impliqués dans l'homéostasie du chlorure. En effet, en se basant sur des études physiologiques, il est prédit que l'accumulation du chlorure chez les agrumes, régulera les gènes impliqués dans les transporteurs membranaires de Cl^- (Moya *et al.*, 2002; Roberts, 2006; Tadeo *et al.*, 2008). De même l'analyse globale de microarrays sur des plants d'agrumes salinisés, confirme le fait que l'accumulation des chlorures perturbe l'expression génique contrôlant les principaux paramètres physiologiques. Des mutations dans le gène *Sos1* engendrent des phénotypes sévèrement sensibles au sel, dus à un efflux altéré de sodium (Wu *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2002).

L'étude de Brumós *et al.* (2009) a révélé que la perception de la salinité ainsi que le signal qui suit, sont radicalement différents chez les agrumes sensibles et tolérants, déclenchant diverses réponses. En effet, la régulation d'une exclusion efficace du chlorure est atteinte à travers une régulation différentielle des transporteurs Cl^- . Différentes étapes clé ont été révélées pour être associées à la différenciation génétique entre les espèces d'agrumes cultivées sensibles et tolérantes au stress salin (Moya *et al.*, 2002, 2003; Arbona *et al.*, 2005; López-Climent *et al.*, 2008). A titre d'exemple, il a été montré que le porte-greffe citrange Carrizo (CC) est un hybride dont la base génétique est probablement optimale pour un développement et une croissance adéquats en conditions normales, mais plutôt inefficace sous conditions de stress salin. Au contraire, le mandarinier Cléopâtre (MC) a été sélectionné comme porte-greffe dans certaines régions justement parce qu'il est tolérant à la salinité. De façon intéressante, *Nrt1-2* a

fortement été réprimé chez CC et légèrement induit chez MC (Brumós *et al.*, 2009). L'approche de génomique comparative a permis d'identifier des gènes de protéines de transport différentiellement exprimés chez CC et MC et qui pourraient potentiellement être impliqués dans la régulation de l'homéostasie de Cl⁻. Pour notre étude, *Sos1* et *Nrt1* illustrent la signature au niveau moléculaire d'une pression sélective au niveau de notre échantillon total. Cette forme de sélection aurait sans doute affecté différemment la distribution des fréquences alléliques des loci SNPs engendrant une différenciation génétique inter groupes variétaux.

À un moindre degré mais pas négligeable, la sélection positive ayant touché ces deux gènes ainsi que le gène *Ccc*, a particulièrement différencié les espèces *C. maxima* et *C. reticulata*, suggérant une prédisposition différentielle de leur tolérance au sel.

Considérant les 4 taxons ancestraux étudiés, les deux gènes *Nrt1a* et *Sos1* sous sélection positive sont associés à un haut niveau de différenciation allélique entre taxons ($F_{st}= 0.68$ et $F_{st}=0.886$, respectivement).

À l'échelle intraspécifique, pour *Sos1* 18 sites de polymorphismes SNPs spécifiques à *C. reticulata* ($\pi_{\text{nonsyn}}/\pi_{\text{syn}}=0.96$ pour *C. reticulata*) impliquant des changements dans la composition en acides aminés ont été observés. Ce polymorphisme moléculaire pourrait être associé à une physiologie particulière de *C. reticulata* vis-à-vis du stress salin. De même, pour *Nrt1A* *C. reticulata* présente 4 sites de polymorphismes SNPs spécifiques entraînant un degré de différenciation allélique entre accessions. Une autre valeur intraspécifique relativement élevée a été notée pour *C. maxima* avec le locus *CCC* ($\pi_{\text{nonsyn}}/\pi_{\text{syn}}=0.83$). Seuls 2 loci SNPs polymorphes spécifiques au pamplemoussier sont associés à des changements de la composition de la protéine.

A ce niveau, la distinction de ces deux espèces *C. reticulata* et *C. maxima* est appuyée par une étude récente qui a montré que la tolérance à la salinité chez les agrumes apparaît seulement dans le genre *Citrus* et principalement chez deux espèces ancestrales, les mandariniers (*C. reticulata*) et les pamplemoussiers (*C. maxima*). Les espèces et cultivars secondaires comme les bigaradiers, les orangers, les citronniers et les pomélos, dont l'origine génétique est liée aux deux espèces parentales (*C. reticulata* et *C. maxima*), disposent de formes héréditaires de tolérance de la part de leurs parents (Hussain *et al.*, 2012). Suggérant que Papéda, pourrait aussi contenir des indices de tolérance à la salinité, il a été proposé d'élargir les recherches sur la tolérance à la salinité pour des programmes d'amélioration génétique des porte-greffes du genre *Citrus*, aux trois groupes, mandariniers, pamplemoussiers et Papéda.

A titre d'exemple, et dans un même contexte d'étude portant sur d'autres gènes, la diversité allélique des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des caroténoïdes a montré que le polymorphisme des gènes de différentes étapes clé est associé à la différenciation entre espèces d'agrumes cultivées (Kato *et al.*, 2004; Fanciullino *et al.*, 2006, 2007).

Par ailleurs si on s'intéresse à la littérature portant sur les autres gènes étudiés, différemment impliqués dans la réponse au stress, on trouve que Yamamoto *et al.* (2005) ont examiné les effets de l'expression du gène apoplastique ascorbate oxydase (*Aao*) sur la tolérance au stress salin chez le tabac et chez *Arabidopsis*, et ont suggéré l'importance de la suppression de l'expression d'*Aao* apoplastique sous condition de stress salin sur la germination et l'augmentation du rendement. Les plantes sont dotées d'enzymes antioxydantes comme l'ascorbate peroxydase (*Apx*) pour nettoyer les espèces d'oxygène actives (AOS), responsables sous stress abiotique de dégâts à la plante (Shigeoka *et al.*, 2002). Le tréhalose, corrélé à la tolérance à différentes conditions de stress a fait l'objet d'une étude qui a démontré que sous stress hydrique, salin et oxydatif, les tomates transgéniques ayant subi l'introduction du gène tréhalose-6-phosphate synthase (*Tps1*), ont une meilleure tolérance que les types sauvages, suggérant que les modifications des glucides produites par la biosynthèse du tréhalose sont associées à la réponse au stress (Cortina et Culiáñez-Maciá, 2005). Chez le genre *Citrus*, aucun des gènes ascorbate oxydase (*Aoc*), ascorbate peroxydase (*Lapx*) et tréhalose-6-phosphate synthase (*Ts*) n'a présenté une sélection positive. Les niveaux très faibles de divergence non synonyme en *Aoc* et *Lapx* (0.06 et 0.19, respectivement) et à moindre degré en *Ts* (0.81), relèvent d'une forte sélection pour des séquences d'acides aminés conservées dans ces gènes, ce qui joue un rôle crucial dans des métabolismes aussi importants comme celui de l'ascorbate et du sucre/amidon.

D'après nos résultats, les deux gènes *Nrt1a* et *Sos1*, déterminants très importants de la tolérance à la salinité, sont sous sélection positive aussi bien au niveau de l'échantillon total qu'à l'échelle des taxons de base uniquement. A cet effet, la population Tunisienne est plus concernée par le gène *Sos1*. Des différences au niveau des régions codantes de ces deux gènes chez les différents génotypes étudiés, traduisant par conséquent, des variations dans les séquences en acides aminés entre taxons, sont susceptibles d'affecter les réponses de ces génotypes au stress salin (Annexes F.II et F.III). En outre, cette sélection positive est associée à un degré élevé de différenciation allélique entre taxons; elle pourrait donc résulter de pressions sélectives différentielles entre les zones de différenciation géographique des différents taxons ancestraux.

Lors d'une étude sur 45 génotypes d'agrumes du genre *Citrus* et genres apparentés portant sur 9 gènes putatifs pour la tolérance au stress salin (*Aoc*, *Lapx*, *Ccc1*, *Mrp4*, *Hkt1*, *Nadk2*, *Pip1*, *Sos1*, *Tsc*), la diversité du rapport ($\pi_{\text{nonsyn}}/\pi_{\text{syn}}$) a varié entre 0.01 pour *Pip1* et 2.12 pour *Nadk2* (Garcia-Lor *et al.* 2013). Un tel écart suggère que les contraintes sélectives et/ou l'histoire de l'évolution adaptative varient d'un gène à l'autre. Seul le gène *Nadk2* (NAD kinase) qui joue un rôle essentiel dans la phosphorylation de NAD(H) (Berrin *et al.*, 2005) et qui est lié à la réponse au stress abiotique chez les plantes (Chai *et al.*, 2005, 2006), était sous sélection positive, affichant des variations au niveau des séquences en acides aminés entre les 8 taxons ancestraux ainsi que les espèces secondaires et les hybrides étudiés. Le reste des gènes a montré des profils neutres. Les différences trouvées au niveau des régions codantes de *Nadk2*, et par conséquent les changements dans les séquences en acides aminés entre taxons, peuvent affecter les réponses de ces génotypes au stress abiotique.

Nous avons analysé au niveau protéique les modifications apportées par les mutations non synonymes au loci *Nrt1a* et *Sos1* au niveau de tous les génotypes analysés. Il est clair que la répartition de la diversité au niveau protéique est différente entre les deux gènes. Cette répartition est directement liée à la phylogénie des fragments chromosomiques portant ces gènes. En effet, la majorité de la diversité allélique des gènes que nous avons étudiés, et donc de la diversité protéique correspondante se retrouve entre les taxons de base (pamplemousse – *C. maxima*-, cédrat –*C. medica*- mandarine –*C. reticulata*- et Papéda –*C. micrantha*-) à partir desquels ont résulté toutes les espèces cultivées du genre *Citrus* (Nicolosi *et al.*, 2000; Ollitrault *et al.*, 2003; Fanciullino *et al.*, 2006). Ce résultat est en accord avec la très forte structuration génétique et phénotypique existante au sein du germoplasme des agrumes issu de ces taxons de base et conforme aux résultats d'une étude récente mettant en œuvre la technologie *SSCP* pour analyser le polymorphisme de 9 gènes candidats codant pour des enzymes clé des voies de biosynthèse des sucres et des acides organiques (Luro *et al.*, 2011). Cette étude a montré que la structure de la diversité de l'ADN et des métabolites primaires du genre *Citrus* est organisée autour des trois groupes correspondant aux espèces ancestrales (mandarine, pamplemousse et cédrat). En outre, la diversité biochimique était fortement corrélée à la diversité moléculaire *SSCP* à l'échelle du genre mais pas à l'échelle intraspécifique (Luro *et al.*, 2011).

Pour nos deux gènes d'intérêt *Nrt1a* et *Sos1*, les données de séquences ont souligné la variabilité en acides aminés des protéines correspondantes, qui ont probablement été soumises à la sélection. Donc, ces gènes sont de bons candidats pour conduire des études de séquençage

complet. En effet, le séquençage complet (incluant le séquençage de la séquence promotrice) de ces gènes, appuyé d'une analyse fonctionnelle approfondie des différents allèles de ces gènes pourraient fournir des pistes de réflexion intéressantes sur la base moléculaire de la différenciation phénotypique et considérablement améliorer nos connaissances et notre compréhension des rôles que ces gènes jouent sur la tolérance au stress salin chez les espèces du genre *Citrus*.

Dans le cadre d'études mettant en valeur des relation entre polymorphisme moléculaire et phénotypique, l'identification de SNPs avec une probabilité élevée de modifier la fonction protéique (SNPs codants) ou l'expression des gènes (SNPs de régulation) devraient constituer la priorité absolue pour le génotypage (Tabor *et al.*, 2002). Il est également envisageable de tirer partie des déséquilibres gamétiques entre les SNPs que nous avons identifiés et les polymorphismes moléculaires directement impliqués dans la différenciation fonctionnelle pour valider le rôle de ces gènes candidats dans le cadre d'études de génétiques d'association (Rafalski, 2002; Zhu *et al.*, 2008).

En dépit de la discussion précédente sur l'occurrence d'une pression sélective exercée sur les deux gènes *Nrt1a* et *Sos1*, et malgré l'absence de certains génotypes de référence lors de la 1ère étude avec les SSRs, on peut dire que l'organisation génétique du genre *Citrus* obtenue à partir des données SNPs (Figure 19) concorde avec les relations génétiques révélées avec les données des marqueurs SSRs d'études précédentes (Ollitrault *et al.*, 2010; Garcia-Lor *et al.* 2012; Snoussi *et al.*, 2012). Ceci laisse supposer que les structures de diversité relatives aux deux types de marqueurs SNPs et SSRs pourraient dériver des composantes évolutives d'un même type. Par conséquent, une évolution neutre est la plus probable pour la majorité des marqueurs SNPs que nous avons identifiés.

4-3- Relations phylogénétiques

4-3-1- Organisation de la diversité ancestrale du genre *Citrus*

L'amélioration et la création de nouveaux cultivars d'agrumes de haute qualité, dépend d'une information fiable relative aux relations entre les différentes espèces du genre *Citrus*. Les types sauvages et ancestraux pourraient posséder des allèles apportant un certain nombre de caractères bénéfiques, qui seraient utiles aux programmes d'amélioration des espèces du genre *Citrus*. Il est par conséquent, important d'avoir une phylogénie des relations entre espèces bien fondée, non seulement pour faire avancer les stratégies d'amélioration mais aussi pour

développer les stratégies de conservation des taxons sauvages et ancestraux (Bayer *et al.*, 2009). La combinaison de différents types de marqueurs moléculaires ont prouvé la puissance et l'efficacité de ces outils à réaliser une analyse complète de l'origine et de la phylogénie des agrumes (Nicolosi *et al.*, 2000; Ollitrault *et al.*, 2003; Pang *et al.*, 2007). Certaines analyses phylogénétiques basées sur des marqueurs chloroplastiques ont montré que les espèces des "arbres à fruits d'agrumes vrais" forment un clade (regroupement taxonomique) et aurait donc une origine monophylétique (de Araújo *et al.*, 2003). Ceci est en accord avec une délimitation plus récente des *Citrus* supportée par Bayer *et al.* (2009) qui a suggéré un réexamen des suppositions avancées par Mabberly (2004) sur l'origine du cédrat. Compte tenu de la possibilité du flux de gènes entre les espèces sexuellement compatibles et du fait que l'homme a mis en contact des taxons ayant connu initialement une évolution allopatrique, les études portant sur l'ADN nucléaire, permettant un haplotypage multilocus au sein de différents fragments chromosomiques, sont particulièrement intéressantes. Dans notre étude, toutes les accessions du genre *Citrus* ont constitué un clade clairement différencié de l'outgroup *severinia buxifolia* (Figure 20). De même, les accessions d'une même espèce ont été regroupées dans des clades indépendants séparés les uns des autres supportés par des valeurs de bootstraps très élevées. A défaut d'autres espèces de Papeda, seules deux espèces différentes sont apparues étroitement liées, une accession de Papeda, *C. micrantha* et Nasnaran (*C. amblycarpa*). *C. micrantha* étant probablement le membre le plus primitif du sous genre *Papeda* (Nicolosi *et al.*, 2000).

Selon les résultats d'études ayant utilisé des marqueurs moléculaires nucléaires et chloroplastiques, le Nasnaran, serait un hybride entre *Papeda* et *Eucitrus*, et possède un mitotype de *C. micrantha*, suggérant que ce dernier est son ancêtre femelle (Nicolosi *et al.*, 2000; Froelicher *et al.*, 2011). Les résultats d'Ollitrault *et al.* (2012a) reposant sur plus de 650 SNPs suggèrent qu'il s'agit d'un hybride directe entre un Papeda voisin de *C. micrantha* et un mandarinier acide.

Une observation importante émane de l'arbre phylogénétique relatif aux données issues des gènes candidats de tolérance à la salinité, est que *C. maxima* et *C. medica* sont fortement regroupés et sont clairement séparés de *C. reticulata*. Ce résultat correspond aux résultats obtenus par Garcia-Lor *et al.* (2013), de même qu'à ceux issus de la comparaison des séquences ITS de l'ADNr chez 69 accessions d'agrumes (Kyndt *et al.*, 2010). En revanche, il contraste avec l'information dérivant d'autres études incluant l'analyse des marqueurs SSR, SRAP et CAPS-SNP (Amar *et al.*, 2011), SSRs (Barkley *et al.*, 2006), RAPD, SCAR et

marqueurs ADNcp (Nicolosi *et al.*, 2000) ainsi qu'avec les marqueurs AFLP (Pang *et al.*, 2007). Ceci n'exclut pas des convergences phénotypiques entre les deux espèces ancestrales *C. reticulata* et *C. maxima* selon une étude de Hussain *et al.* (2012) qui était basée sur l'analyse physiologique du comportement d'espèces d'agrumes au stress salin, et qui avait montré que des sources de tolérance à la salinité étaient présentes chez les deux espèces.

Pour la présente étude, aucun hybride intergénérique n'a été inclus, en plus, les loci SNPs étudiés sont présents chez tous les génotypes analysés, ce qui élimine le facteur d'erreur en rapport avec les espèces ancestrales. D'après la classification de Swingle et Reece (1967), tous les taxons d'agrumes cultivés forment le sous genre *Eucitrus*, *Papeda* constitue le 2^{ème} sous genre du genre *Citrus*. *C. maxima*, *C. medica* et *C. reticulata* formant un clade différencié de *C. micrantha*, nos résultats confirment cette organisation.

A partir de nos résultats, un groupe de mandarines acides (*C. sunki*, *C. reshni* et *C. depressa*) s'est clairement différencié des autres mandarines et ce conformément aux travaux précédents (Froelicher *et al.*, 2011).

Des groupes d'agrumes "vrais", les cédrats ont montré la plus faible hétérozygotie observée (0.023). Cette faible fréquence pourrait être expliquée par l'autofécondation, qui est susceptible de réduire la proportion des hétérozygotes. Des résultats en accord avec ceux obtenus par Barkley *et al.* (2006) et Ollitrault *et al.* (2003), confirmant encore le faible taux de polymorphisme intraspécifique et la forte homozygotie des cédrats. Contrairement, les mandarines ont présenté les fréquences d'hétérozygotes les plus élevées observées parmi les espèces ancestrales (0.093). Tandis que les pamplemousses ont montré des valeurs intermédiaires (0.052). Les mandarines constituent un groupe très diversifié. La plupart des variétés de mandarines sont autofécondées ou auto-compatibles mais certains des hybrides sont auto-incompatibles. Les pamplemousses sont connus pour être auto-incompatibles et se reproduisent uniquement par voie sexuée (Roose *et al.*, 1995), ce qui explique les résultats obtenus. Les accessions hybrides sont supposées être fortement hétérozygotes, ce qui concordait avec notre analyse, et manquaient d'allèles uniques ce qui va être présenté plus loin.

L'apomixie partielle a certainement été un élément essentiel dans la limitation des flux de gènes entre *C. maxima* et *C. reticulata*. Ce facteur, en accord avec des études moléculaires antécédentes (Barkley *et al.*, 2006; Luro *et al.*, 2008; Garcia-Lor *et al.* 2012), pourrait aussi expliquer le faible polymorphisme obtenu entre les génotypes analysés au sein de *C. sinensis*,

C. aurantium mais aussi *C. paradisi*, malgré qu'ils soient relativement très hétérozygotes avec tout le jeu de marqueurs SNPs analysé. Ceci confirme l'idée que la plupart du polymorphisme intraspécifique de ces espèces secondaires résulte de mutations ponctuelles, de mouvement d'éléments transposables (Bretó *et al.*, 2001) et de variation épigénétique (Ollitrault *et al.*, 2012a).

4-3-2- Structure en mosaïque des espèces secondaires basée sur les génotypes de référence

Plusieurs études attestent que des combinaisons interspécifiques entre les taxons ancestraux de base (*C. reticulata*, *C. maxima*, *C. medica* et *C. micrantha*) sexuellement compatibles sont à l'origine des espèces secondaires et hybrides récents (Nicolosi *et al.*, 2000; Barkley *et al.*, 2006; Garcia-Lor *et al.*, 2012; Ollitrault *et al.*, 2012a). La contribution relative de ces taxons ancestraux aux génomes de leurs descendants a été estimée par Barkley *et al.* (2006) et Garcia-Lor *et al.* (2012). Cependant ces deux études ont été basées sur des marqueurs SSRs et ces estimations devraient être biaisées par l'homoplasie observée pour ces marqueurs (Barkley *et al.*, 2009). Les génomes des espèces secondaires ont été assimilés à des mosaïques de grands fragments d'ADN des espèces ancestrales, qui résultaient de peu d'évènements de recombinaison interspécifique (Garcia-Lor *et al.*, 2012). Ceci dit, les structures phylogénétiques des espèces secondaires en certains points concrets du génome demeurent encore obscures. Avec les marqueurs génétiques co-dominants, la plupart des espèces secondaires ont montré un fort degré d'hétérozygotie associé à une absence de polymorphisme intervariétal à l'échelle intraspécifique (Federici *et al.*, 1998; Ollitrault *et al.*, 2003; Barkley *et al.*, 2006; Fanciullino *et al.*, 2007). Ces espèces sont de "fausses espèces" typiques associées à une propagation clonale (aussi bien par graines apomictiques que par greffage), où la diversification variétale phénotypique apparaît suite à l'accumulation de variation à partir d'un prototype ancestral hybride, sans recombinaison sexuée (Ollitrault et Navarro, 2012). Pour *C. sinensis*, *C. aurantium*, *C. paradisi* et la Clémentine, les études moléculaires précédentes (Nicolosi *et al.*, 2000; Barkley *et al.*, 2006; Garcia-Lor *et al.*, 2012; Ollitrault *et al.*, 2012a) ont montré que la grande diversité intra-taxon résultait uniquement de mutation et/ou de variation épigénétique sans avoir recours à des évènements de recombinaison sexuée ultérieurs. Par conséquent, relativement à des marqueurs génétiques comme les SSRs ou les SNPs, ces espèces montrent généralement une diversité moléculaire intercultivar très faible ou nulle. Cette rareté de la diversité moléculaire a été confirmée dans la présente étude pour ces espèces secondaires pour les quelles différents génotypes ont été séquencés (*C. sinensis*, *C.*

aurantium, *C. limon* et *C. aurantifolia*). En raison de cette origine de la diversification intra-taxon secondaire, la plupart des conclusions à propos de cette structure en mosaïque déduite à partir d'un ou plusieurs génotypes devrait être étendue aux autres cultivars de la même espèce secondaire.

Un exemple d'espèces secondaires est l'hybride naturel Clémentine, qui possède un fond génétique majoritaire de mandarinier (*C. reticulata*) introgressé à l'état hétérozygote par le pamplemoussier (*C. maxima*) (Garcia-Lor *et al.*, 2012, 2013). L'analyse des 6 gènes sur clémentine a montré 100% d'homozygotie pour la phylogénie mandarine/mandarine pour tous les gènes sauf pour le gène CCC où elle est hétérozygote MP. La position de la clémentine relativement aux oranges douces, aux bigaradiers et aux mandarines dans l'analyse ACP supporte l'hypothèse qui suggère que la Clémentine soit issue de croisement entre la mandarine "Willow leaf" et l'orange douce (Nicolosi *et al.*, 2000; Ollitrault *et al.*, 2012a).

Le bigaradier (*C. aurantium*) est considéré être un hybride naturel entre un mandarinier et un pamplemoussier (Barrett et Rhodes, 1976; Nicolosi *et al.*, 2000; Uzun *et al.*, 2009; Garcia-Lor *et al.*, 2013). L'hétérozygotie interspécifique (MP, Tableau 26) observée pour tous les loci analysés et particulièrement pour *Nrt1a* et *Sos1* est en accord avec cette hypothèse. Cependant, pour deux loci *Aoc* et *Lapx*, les bigaradiers ont montré plus d'allèles originaires du pamplemousse. Un résultat qui mérite d'être exploré d'avantage.

Plusieurs hypothèses ont été proposées concernant l'origine de *C. sinensis*. Selon Barrett et Rhodes (1976), Torres *et al.* (1978), Scora (1988), Nicolosi *et al.* (2000), Moore (2001) et Uzun *et al.* (2009), l'orange douce est l'hybride interspécifique directe entre le pamplemousse (*C. maxima*) et la mandarine (*C. reticulata*), alors que Roose *et al.* (2009) et Garcia-Lor *et al.* (2012) proposent que *C. sinensis* résulterait plutôt d'un backcross de première génération (BC1) [(*C. maxima* x *C. reticulata*) x *C. reticulata*]. Indépendamment de l'absence de polymorphisme moléculaire entre accessions d'orange douce, constaté par d'autres travaux (Fang et Roose, 1997; Novelli *et al.*, 2000; Targon *et al.*, 2000; Novelli *et al.*, 2006), une hétérozygotie phylogénétique interspécifique (MP) a été identifiée pour 5 gènes sur 6. Seul le gène *Ccc1*, présente une homozygotie phylogénétique PP. Ceci contredit les deux hypothèses émises quant à l'origine de cette espèce. Un résultat en accord avec ce qui a été obtenu par Garcia-Lor *et al.* (2013), qui en plus de l'homozygotie phylogénétique PP sur certaines régions, a observé une homozygotie phylogénétique MM dans d'autres régions. Ces observations indiquent que les deux parents de l'oranger avaient une origine interspécifique.

Les résultats obtenus pour les deux génotypes de pomélo (*C. paradisi*) sont cohérents avec une origine du pomélo par hybridation naturelle entre *C. maxima* et *C. sinensis* (de Moraes *et al.*, 2007; Ollitrault *et al.*, 2012a). En effet, 4 profils hétérozygotes interspécifiques (MP) ont été obtenus pour les gènes *Aoc*, *Lapx*, *Ts* et *Nrt1a* tandis que les 2 pomélos étaient homozygotes pour les allèles *C. maxima* (PP) pour les gènes *Ccc1* et *Sos1*.

C. aurantifolia et *C. limon* affichent beaucoup plus de polymorphisme intraspécifique que *C. sinensis*, *C. aurantium* et *C. paradisi*. Les Citronniers de type Eureka seraient issus d'une hybridation entre un bigaradier et un cédratier (Nicolosi *et al.*, 2000; Ollitrault *et al.*, 2012a). L'origine tri-hybride (*C. medica*, *C. reticulata*, *C. maxima*) acceptée pour *C. limon* (Nicolosi *et al.*, 2000; Barkley *et al.*, 2006; Garcia-Lor *et al.* 2012) a été confirmée par nos données de séquences pour les cultivars 'Eureka' et 'Lisbonne', qui affichent les contributions ancestrales suivantes: *C. medica*: 50%, *C. reticulata*: 25% et *C. maxima* 25%. Un résultat soutenu par l'étude de Garcia-Lor *et al.* (2013). De plus, la présence systématique d'allèles de *C. medica*, et le fait que les citrons partagent certains allèles hétérozygotes spécifiques aux bigaradiers, supportent l'hypothèse de Nicolosi *et al.* (2000) attestant que le citron est un hybride direct entre *C. medica* et *C. aurantium*.

Les analyses physiologiques en réponse au stress salin suggèrent la non transmission de la sensibilité du cédrat au citron Eureka (Hussain *et al.*, 2012), et l'aptitude de ce dernier à réduire son métabolisme afin de surmonter le stress salin (Brumos *et al.*, 2009). Les accessions de *C. limon* analysées dans notre étude forment 3 ensembles: Eureka, Lisbonne, Citrons Tunisiens 133 et Arbi 111 sont regroupés d'un côté, et lime Rangpur et Rough lemon sont regroupés d'un autre côté, tandis que Volkameriana apparaît éloigné des 2 premiers clusters (Figure 23 a,b). Les positions relatives de la lime Rangpur, du Rough lemon et de Volkameriana par rapport à celle des taxons ancestraux suggèrent une plus forte contribution de *C. reticulata* et très peu voire pas de contribution de *C. maxima* comparativement aux citrons de type Eureka.

De façon intéressante, relativement aux autres accessions de mandarine, un sous ensemble de mandarines acides (*Cléopâtre*, *Sunki*, *Hayata* et *Shekwasha*), dont *Cléopâtre* et *Sunki* sont bien connues pour leur tolérance au sel (Maas, 1993), pourrait expliquer l'origine de la tolérance à la salinité chez les porte-greffes lime Rangpur, Rough lemon et Volkameriana. En effet, il a été montré que le groupe des mandarines acides (*Cléopâtre*, *Sunki*, *Hayata* et *Shekwasha*) partageait le même mitotype que la lime Rangpur, le Rough lemon et *C.*

volkameriana (Froelicher *et al.*, 2011) et que ce groupe avait également une contribution essentielle aux génomes nucléaires de ces porte-greffes (Ollitrault *et al.*, 2012a).

Sur l'arbre NJ (Figure 21), tous les citrons et limes sont regroupés avec le cédrat. Ce même regroupement a aussi été obtenu par Federici *et al.* (1998), Nicolosi *et al.* (2000) et Barkley *et al.* (2006). La position de la lime Rangpur dans le groupe du cédrat et pas dans celui des mandarines, rejoint l'idée que cette lime reçoit la plupart de la contribution génétique à partir du cédrat et uniquement une petite proportion de la part des mandarines (Barkley *et al.*, 2006). Les études de diversité selon les marqueurs SNPs attestent que la lime Rangpur pourrait être un hybride direct mandarine X cédrat. Federici *et al.* (1998), a aussi obtenu un arbre phylogénétique utilisant les marqueurs RFLP et RAPD qui positionnait les accessions de la lime Rangpur avec les limes au sein du groupe des cédrats. En effet, la lime Rangpur dans cette étude se regroupe avec les autres limes douces de référence.

Nicolosi *et al.* (2000) ont proposé que la lime mexicaine (*C. aurantifolia*) est un hybride entre *C. medica* et *Papeda*. L'analyse actuelle avec les 6 gènes candidats de tolérance à la salinité confirme cette conclusion. Alemow (*C. macrophylla*) et mandarinier Nasran (*C. amblycarpa*) sont groupés avec ces limes et dans le groupe de *Papeda* (*C. micrantha*). Nasran est généralement considéré comme un hybride mandarine. Nos résultats sont en accord avec ceux de Froelicher *et al.* (2011), suggérant que cet hybride est issu de croisement entre mandarine et *C. micrantha*. De même pour l'ACP qui a montré une position intermédiaire de Nasran entre *Papeda* et le groupe des mandarines acides. Toujours placés très proches, la lime mexicaine et ses variants ainsi qu'Alemow ont une position intermédiaire entre le groupe des cédrats et celui de *Papeda*. Pour la lime mexicaine, cette position est en accord avec l'hypothèse de Nicolosi *et al.* (2000) et celle de Froelicher *et al.* (2011).

La diversité des cédrats révélée par notre étude est très faible de même que leur hétérozygotie. La caractéristique d'homozygotie et l'autofécondation préférentielle offrent des possibilités de fixation des caractères et une multiplication pratiquement conforme par semis malgré l'absence d'apomixie chez cette espèce.

Les génomes complets de la clémentine haploïde et de l'orange douce sont aujourd'hui librement disponibles sur internet (phytozome.org), ouvrant les portes à une large gamme de recherches, comme les études sur les mécanismes de résistance aux maladies, l'évaluation des attributs de qualité des fruits et la tolérance aux stress abiotiques. Les généticiens des agrumes pourront examiner et comprendre la diversité génétique résidente dans le pool de

germoplasme des agrumes, incluant non seulement les espèces du genre *Citrus* mais aussi les autres genres très apparentés (Gmitter Jr. *et al.*, 2012). En s'appuyant sur la séquence complète du génome, l'identification de l'origine phylogénétique des 6 gènes dument étudiés, suite à 27 autres (Garcia-Lor *et al.*, 2013), contribue au décodage de la structure du génome interspécifique des espèces secondaires. Dans le futur, la distribution allélique chez les génotypes d'origine interspécifique, combinée avec des analyses plus approfondies de la fonctionnalité des allèles des différentes espèces ancestrales, contribueront à comprendre et à exploiter la base moléculaire de la variabilité phénotypique.

4-3-3- Origine du polymorphisme intra espèce secondaire en Tunisie

Ce travail constitue la première étude de la diversité de gènes candidats pour la tolérance à la salinité au sein du germoplasme d'agrumes Tunisiens. Pour nos marqueurs SNPs analysés relatifs à ces gènes candidats et mis à part quelques exceptions, la majorité des accessions tunisiennes se regroupent conformément avec leurs accessions de références respectives mettant en valeur la structuration de la diversité du germoplasme tunisien au sein d'une variabilité plus globale. Les regroupements sont en général cohérents avec la classification des groupes variétaux. Un résultat qui a aussi été validé avec les marqueurs SSRs lors de la 1ère étude (Snoussi *et al.*, 2012).

On a noté que certains bigaradiers présentent des profils différents de ceux des accessions de référence de la même espèce. Avec le gène *Aoc*, le bigaradier de référence Maroc est le plus hétérozygote des accessions de référence avec 50% des loci qui sont hétérozygotes sur un total de 18 loci. D'après les données SNPs, il apparaît clair que pour tous les bigaradiers tunisiens hormis le bigaradier 11, il s'agit d'une fixation à l'état homozygote de tous les SNPs hétérozygotes chez le bigaradier Maroc pour ce gène. Il est également envisageable qu'il y ai eu des problèmes de compétition allélique durant la PCR masquant un allèle chez certaines accessions pour qui l'analyse SSR a proposé diverses origines (hybridation, mutation).

Pour le gène *Lapx*, les bigaradiers de référence sont hétérozygotes pour 4 loci sur 9, un état qui se reproduit chez tous les bigaradiers tunisiens à l'exception des bigaradiers 1, 3 et 46. Pour le gène *Ccc* et sur 9 loci hétérozygotes sur 28 loci SNPs, la fixation de ces loci à l'état homozygote a été retrouvée chez le bigaradier tunisien 11 (aux loci *Ccc*-106pb, 268pb, 358, 378, 520, 697, 710, 748), le bigaradier 43 (au locus *Ccc*-106pb), le bigaradier 1 (aux loci *Ccc*-166pb, 358, 378, 520), le bigaradier 4 (au locus *Ccc*-378pb), le bigaradier 8 (aux loci *Ccc*-710 et 748pb) et le bigaradier 158 (aux loci *Ccc*-378 et 520pb). Pour le gène *Ts*, seul un locus sur

15 est hétérozygote chez les bigaradiers de référence (locus *Ts*-352pb), pour lequel trois des accessions tunisiennes 1, 3 et 46 sont à l'état homozygote.

Concernant le gène *Nrt1a*, 8 loci sur 21 sont hétérozygotes pour les bigaradiers de référence. Pour ces loci hétérozygotes chez les références, le bigaradier 3 était le génotype tunisien qui a présenté le plus de locus à l'état homozygote (5 loci: *Nrt1a*-166pb, 292, 298, 315 et 316pb). Il est suivi du bigaradier 11 homozygote aux loci *Nrt1a*-52pb, 103 et 212pb, puis du bigaradier 1 homozygote pour le locus *Nrt1a*-166pb. Deux loci intéressants *Nrt1a*-212pb et *Nrt1a*-315pb (flèches noire en pointillés sur la figure F.IIb), le 1er est hétérozygote chez tous les bigaradiers y compris ceux de référence mais à l'état homozygote chez seulement le bigaradier tunisien 11. Le 2ème locus SNPs est hétérozygote chez tous les bigaradiers et homozygote uniquement pour le bigaradier de référence bouquet de fleurs et le bigaradier tunisien 3. Cette variabilité se traduit par des changements en acide aminé au niveau de ces deux sites et pour les génotypes en question (bigaradiers 3, 11 et bouquet de fleurs) (Figure F.IIb), ce qui peut à son tour affecter la fonctionnalité de la protéine issue de ce gène chez ces génotypes. Les autres mutations révélées sur les autres sites hétérozygotes (flèche bleue sur la figure F.IIb) sont synonymes et n'induisent pas de changement de la protéine à ce niveau. Ces résultats associés à la structure de l'arbre de phylogénie protéique de *Nrt1a* confirment la particularité des bigaradiers tunisiens 1, 3 et 11 qui se regroupent loin de tous les autres bigaradiers. Une telle analyse de la variabilité devrait être accompagnée d'une étude physiologique afin d'apporter plus d'éléments de réponse pour pouvoir discuter de la tolérance au sel des bigaradiers en question.

Enfin pour le gène *Sos1*, le bigaradier 1 est le seul bigaradier tunisien homozygote pour 8 loci sur 30 qui sont hétérozygotes chez les bigaradiers de référence (locus *Sos1*-40pb, 69, 125, 206, 244, 272, 294 et 383pb). Deux loci intéressants *Sos1*-364pb et *Sos1*-470pb (flèches en pointillés sur la figure F.IIIb) ont la particularité d'être hétérozygotes chez les bigaradiers de référence mais à l'état homozygote chez tous les bigaradiers Tunisiens. Cette variabilité génomique entraîne une séquence différente de la protéine au niveau de ces deux sites, ce qui peut à son tour affecter la fonctionnalité de la protéine issue de ce gène chez nos génotypes tunisiens affectés par ces changements. Ceci dit, une étude physiologique devrait apporter des informations complémentaires permettant de confirmer la tolérance du bigaradier 1 au sel. L'origine du polymorphisme intraspécifique pour les bigaradiers tunisiens peut être attribuée à une autofécondation des formes d'origine mises en évidence avec l'étude SSRs.

Le bigaradier 1 présente pour les 6 gènes étudiés 75% d'allèles mandarine et 25% d'allèles pamplemousse. Ces données SNPs rejoignent les résultats issus des marqueurs SSRs pour suggérer un éventuel backcross de 1^{ère} ou 2^{ème} génération avec le pool de gène *C. reticulata*.

Certains bigaradiers tunisiens présentent des allèles spécifiques, non observés dans nos accessions de *C. reticulata* ou de *C. maxima*. C'est le cas des bigaradiers Tunisiens 8, 11, 43, 46, 158 et 190 (en *Aoc*-343pb) tous homozygotes pour l'allèle spécifique excepté le bigaradier 11, et qui partagent cet allèle avec les bigaradiers de référence, Maroc (hétérozygote) et bouquet de fleurs (homozygote). Tous les bigaradiers sauf le bigaradier 1 en *Ccc1*-166pb, le bigaradier Tunisien 3 en *Ccc1*-186pb, *Ccc1*-267pb et *Ccc1*-282pb, les bigaradiers Tunisiens 1 et 43 en *Ccc1*-371pb. Pour le gène *Nrt1a*, tous les bigaradiers étaient différents du bigaradier 11 en *Nrt1a* -103pb, en *Nrt1a* -157pb le bigaradier 11 partage un allèle spécifique avec les seules orange Valencia Late et Meski, en *Nrt1a* -271pb ce bigaradier particulier possède un allèle spécifique aux pamplemousses Chandler, Kao Pan et de Timor qu'il est le seul à partager avec l'orange Tunisienne Meski. Pour *Sos1*, le bigaradier Tunisien 11 en *Sos1*-355pb et enfin tous les bigaradiers Tunisiens sauf le bigaradier 1 en *Sos1*-367pb. Un tel résultat confirme la particularité des bigaradiers tunisiens en certains sites SNPs par rapport aux bigaradiers de référence et suggère l'absence des mandarine et pamplemousse parentaux de ces génotypes du germoplasme analysé.

Pour le groupe variétal des oranges, mis à part les exceptions suivantes, l'orange tunisienne Meski ainsi que l'accession de référence Valencia late, présentent les mêmes allèles pour tous les loci des 6 gènes analysés. L'orange Meski, particulièrement tolérante au sel, possède un allèle différent de ceux de l'orange valencia Late au locus SNP *Nrt1a* -271pb. Toutefois, cette mutation à l'origine du polymorphisme de l'orange commune n'implique pas de variation de la séquence protéique.

Les positions dans l'analyse ACP des bigaradiers et des oranges tunisiennes avec *C. reticulata* et *C. maxima* utilisés comme individus actifs (Figure 23a) montrent que les bigaradiers tunisiens 1, 3, 4 et 12, ainsi que l'orange Meski ont une portion prédominante de leur génome qui provient du pool de gène de *C. reticulata*, un résultat confirmé pour les bigaradiers et orange de référence par des études antérieures avec les marqueurs SNPs (Ollitrault *et al.*, 2012) et les marqueurs SSRs (Roose *et al.*, 2009; Garcia-Lor *et al.*, 2012). Pour le reste des bigaradiers tunisiens, l'ACP suggère une prédominance du pool de gène de *C. maxima*. Ces résultats concordent avec l'analyse NJ (Figure 21).

Conformément aux résultats de notre étude avec les marqueurs SSRs, les citrons analysés sont fortement hétérozygotes et pas très différents les uns des autres. Comme pour les autres groupes variétaux, la recherche d'allèles présents chez les citronniers tunisiens mais absents chez les citronniers de référence et les parents potentiels révèle trois loci (*Ccc1*-267pb, 282pb et *Ccc1*-664pb) à partir de 121 analysés. Pour *Ccc1*-267pb et 282pb le citronnier tunisien 133 a montré un allèle spécifique qu'il partage uniquement avec le bigaradier tunisien 3, le 3ème locus est le *Ccc1*-664pb, pour lequel l'accession de citron tunisienne 111 partage un allèle unique que seul le *C. volkameriana* révèle. En *Ccc1*-748pb, ce même citronnier a un profil hétérozygote différent de celui des références par un allèle parental qu'on retrouve chez les bigaradiers. L'origine du polymorphisme intraspécifique chez les citrons tunisiens pourrait être attribuée aux mutations somatiques des citrons de référence. Ceci dit, sur l'arbre NJ (Figure 21), tous les citrons sont regroupés avec le cédrat. Ce même regroupement a aussi été obtenu par Federici *et al.* (1998), Nicolosi *et al.* (2000) et Barkley *et al.* (2006). En ACP, leur position a toujours été intermédiaire entre les groupes parentaux de *C. medica* et *C. aurantium* pour chaque axe factoriel.

La 1ère étude avec les marqueurs SSRs a prouvé que les limes Tunisiennes 'Arbi' et 'Beldi' étaient des variants phénotypiques de la lime mexicaine (Snoussi *et al.*, 2012). L'analyse actuelle avec les 6 gènes candidats de tolérance à la salinité confirme cette conclusion.

D'une façon intéressante, la lime 'Chiiri' est dans tous les cas groupée avec les cédrats ou positionnée entre cédrat et *Papeda*. La contribution de la lignée parentale *C. medica* pour ce génotype est égale à 83.35%, alors que celle de *C. micrantha* n'est que 16.67%. En plus, c'est un génotype fortement homozygote à comparer avec les autres groupes du genre *Citrus*.

Par ailleurs au niveau protéique, pour tous les sites non synonymes des acides aminés relatifs aux gènes *Nrt1a* et *Sos1* (Figures F.IIb et F.IIIb, respectivement), on a remarqué que la lime 'Chiiri' peut avoir soit le même acide aminé que les cédrats et la lime mexicaine, ou partager un même acide aminé avec les cédrats mais qui est différent de celui de la lime mexicaine. De telles mutations n'impliquent pas de variation de la séquence protéique. D'où le rapprochement toujours retrouvé entre lime 'Chiiri' et lime mexicaine.

Une analyse locus par locus de la lime 'Chiiri' avec la lime mexicaine et le cédrat a révélé une fixation à l'état homozygote chez cette lime tunisienne de certains loci SNPs (4 pour le gène *Aoc*, 10 pour *Ccc1*, 6 pour *Nrt1a* et 9 pour *Sos1*) partagés avec les 4 représentants du cédrat mais qui sont à l'état hétérozygote et par conséquent différents de ceux chez l'accession de

référence lime mexicaine. Spécifiquement avec la lime mexicaine, la lime 'Chiiri' partage 3 SNPs hétérozygotes pour *Lapx* et 7 SNPs hétérozygotes pour *Ts*. De façon intéressante un seul locus (*Sos1*-499pb) présente la lime 'Chiiri' avec une composition allélique hétérozygote différente de ses deux parents putatifs homozygotes. Selon les analyses ACP portées sur les gènes candidats de tolérance à la salinité, cette lime tunisienne tolérante au sel est toujours en position intermédiaire entre cédrat et lime mexicaine (Figure 23). Particulièrement pour les gènes d'intérêt *Nrt1a* et *Sos1*, la lime 'Chiiri' a une portion prédominante de son génome qui provient du pool de gène de *C. medica* (Figures 17, 18 et 24). Ceci confirme sans aucun doute l'implication du génome du cédrat dans la formation de cette lime tunisienne. Une hypothèse confirmée quand on regarde l'analyse NJ (Figure 21). Par ailleurs, aucun allèle rare n'a été trouvé pour cette accession Tunisienne particulière. De telles observations rejoignent les résultats de l'analyse SSRs (Snoussi *et al.*, 2012), et permettent de conclure que la lime 'Chiiri' résulte d'un croisement entre la lime mexicaine ou l'un de ses mutants et le cédrat.

Il a été montré que la sensibilité du cédrat au sel n'est pas transmise au citron Eureka (Hussain *et al.*, 2012). Par ailleurs cette même étude a montré la sensibilité de la lime mexicaine au stress salin. Par conséquent, il est probable que la capacité à tolérer la salinité chez la lime 'Chiiri' soit liée à son ancêtre parental *Papeda*, dans ce cas il serait utile d'étendre l'étude à plusieurs autres accessions de cette espèce ainsi qu'à plusieurs autres gènes candidats afin de fournir d'avantage d'éléments qui nous permettront de mieux comprendre l'origine de cette lime ainsi que sa phylogénie évolutive en matière de tolérance au sel. L'autre hypothèse est que comme le citron Eureka, la lime 'Chiiri' serait capable de gérer différemment son métabolisme afin de faire face au stress salin.

Les limes 'Arbi179' et 'Beldi131', qui représentent le 2^{ème} MLG des limes tunisiennes, ont toujours révélé le même génotype que celui de la lime mexicaine pour tous les loci des 6 gènes analysés. Les analyses SSRs, NJ et ACP confirment ce résultat.

Une analyse locus par locus de la lime douce 180 avec les deux limes douces de référence (de Palestine et Brésilienne) a révélé une fixation à l'état homozygote chez cette lime tunisienne de certains loci SNPs (6 pour le gène *Aoc*, 1 pour *Ccc1*, 1 pour *Nrt1a* et 2 pour *Sos1*) qui sont à l'état hétérozygote chez les accessions de référence. Lors de cette analyse la lime douce 180 est pour la plupart des loci hétérozygote pour l'un des allèles des accessions de référence (pour lequel ces dernières sont homozygotes), l'autre allèle étant différent de celui présenté par les accessions de références. Ces loci particuliers sont les suivants: *Ccc1*-106pb, 268, 358,

378, 520 et 697pb, *Nrt1a*-166pb, 292, 298, et 315pb, *Sos1*-23pb, 40, 125, 244, 272, 294, 364, 383 et 470pb. La vérification de ces loci montre qu'à chaque fois la lime douce tunisienne présente les mêmes allèles que la lime Rangpur et le Rough lemon. En un seul locus *Ccc1*-268pb, cette lime révèle un profil différent de celui des limes de référence et des parents putatifs. Seuls les citrons de référence possèdent un tel profil. Ceci milite en faveur d'une mutation du type original de cette lime, qui apparaît davantage apparenté à la lime Rangpur et au rough lemon bien qu'ils soient acides. L'analyse SSRs a aussi confirmé la ressemblance entre cette lime et la 'limonette de Marrakech' malgré la différence d'acidité entre elles. Sachant que la lime Rangpur est considérée comme tolérante au sel (Maas, 1993). Une telle ressemblance entre la lime douce 180 et la lime Rangpur devrait être mieux explorée afin de renseigner d'avantage sur les capacités de tolérance au stress salin de cette lime tunisienne qui a fait ses preuves au sud du pays (oasis, Degache, Tozeur).

Chapitre III

Analyse de la conformité génétique des porte-greffes d'agrumes des collections en Tunisie

La vérité scientifique a pour signe la cohérence et l'efficacité. La vérité poétique a pour signe la beauté.

Aimé Cesaïre

I- Introduction

En Tunisie comme dans le monde, l'utilisation et la gestion des ressources génétiques (agrumicoles et autres), base de l'amélioration des espèces et des variétés et de l'assurance qualité dans la production de semences, est d'autant plus importante que la demande en variabilité génétique s'est fortement accrue durant les dernières décennies. Cet accroissement est motivé par la nécessité de répondre aux besoins d'adaptabilité aux différentes contraintes du milieu et aux exigences du moment, en vue de contribuer efficacement et durablement à l'accroissement de la demande en produits alimentaires. Une des options essentielles pour l'amélioration de la productivité agrumicole à court terme est de commencer par identifier et évaluer les ressources génétiques en porte-greffes d'agrumes pour mieux les gérer.

En plus de la fonction de conservation des ressources génétiques, les parcs semenciers et parcs à bois permettent la diffusion du matériel conservé aux pépiniéristes et aux cultivateurs. Pour garantir un système de multiplication conforme des porte-greffes, il faudra s'appuyer sur la création de collections maintenant des clones bien identifiés, lesquels seront propagés en filiation directe et stricte. Si la chaîne de propagation n'est pas suffisamment structurée et contrôlée, les risques de dissémination de porte-greffes qui s'avèreraient non conformes sont importants. Le souci que de tels risques soient encourus dans la chaîne de propagation des porte-greffes d'agrumes en Tunisie, nous a poussés à vérifier l'état de conformité des porte-greffes dans les principaux parcs semenciers.

L'introduction de porte-greffe en collection en Tunisie ayant été réalisée par graines de génotypes partiellement apomictiques, soulève des interrogations particulières concernant leur conformité génétique, en particulier pour leur ploïdie (Aleza *et al.*, 2011) et leur origine somatique ou zygotique (Xiang et Roose, 1988).

En effet l'apomixie est facultative chez les agrumes, et relève de la polyembryonie nucellaire adventive dans des graines contenant aussi un embryon zygotique. Ainsi, la compétition entre les embryons nucellaires et l'embryon zygotique durant le développement et la germination de la graine détermine la fréquence des plants apomictiques parmi tous les plants issus de semis (Kepiro et Roose, 2007). Les graines issues de reproduction sexuée engendrent des arbres d'origine zygotique indésirables dans ce contexte. Un exemple concret présenté dans le 1er chapitre montre l'occurrence de 21.4% de bigaradiers zygotiques dans un verger d'arbres-

mères pour la propagation par graines (parc Sbikha). Par conséquent, la vérification aussi bien pomologique que génétique du matériel destiné à être propagé est nécessaire.

Par ailleurs, malgré la rareté des génotypes polyploïdes dans les banques de gènes et les collections d'agrumes, il apparaît que les événements de polyploïdisation sont relativement fréquents lorsque des populations de semis sont analysées. En effet, il a été montré que la tétraploïdisation est un événement fréquent dans les graines des agrumes diploïdes des genres *Citrus* et *Poncirus* ainsi que chez leurs hybrides intergénériques. Des facteurs génotypiques et environnementaux affectent le taux de tétraploïdie. Les fréquences les plus élevées de tétraploïdie ont été observées pour des hybrides intergénériques d'orange douce et *Poncirus* (citranges 'Carrizo' et 'Troyer') cultivés en région méditerranéenne, où les fréquences des plants de semis tétraploïdes pouvaient dépasser les 20%. Les analyses moléculaires ont définitivement montré que les tétraploïdes trouvés dans les plants de semis des agrumes diploïdes apomictiques résultent du doublement chromosomique de cellules nucellaires (Aleza *et al.*, 2011), ce résultat venant confirmer des recherches antérieures (Frost et Soost, 1968; Kobayashi *et al.*, 1981). D'un autre côté, le second mécanisme qui peut aussi avoir lieu est la formation d'ovules non réduits par restitution de la seconde division de la méiose, qui produit des hybrides triploïdes dans les hybridations entre diploïdes. Il semble que la plupart des triploïdes spontanés provenant de parents diploïdes se trouvent dans des graines petites et anormales (Aleza *et al.*, 2010a), qui ne sont probablement capables de germer sans la mise en œuvre d'une procédure de sauvetage d'embryon.

Afin de répondre à notre objectif, le recours à des outils performants et utilisables en routine permettant la caractérisation de la ploïdie et de l'origine génétique de chaque arbre en collection était donc indispensable. A ces fins, nous avons utilisé respectivement la cytométrie en flux et des marqueurs SSRs.

Des échantillons de feuilles ont été collectés pour les arbres présents dans trois collections (collections du GIFruits et de l'INRAT à El Gobba (Cap-Bon) et collection du GIFruits à Sbikha) (Figure 25) avec pour objectifs spécifiques:

- La caractérisation génétique des accessions en collection en Tunisie.
- L'évaluation de l'homogénéité des collections tunisiennes.
- Le contrôle de la conformité des Porte-greffes par rapport aux témoins de Corse.



Figure 25. Porte-greffes (bigaradiers) faisant partie de la collection du GIFruits à Sbikha

II- Matériel et Méthodes

2-1- Matériel végétal

2-1-1- Parcs semenciers

Notre travail a porté sur 160 porte-greffes répartis sur deux parcs semenciers (plantés en 1996), celui de Sbikha et celui d'El Gobba (Tableau 27). Les lignes à Sbikha comportent 10 arbres par porte-greffe ; pour que notre échantillonnage ait le même poids pour les deux parcs et bien qu'à El Gobba, certains porte-greffes soient représentés par beaucoup plus d'arbres (principalement le bigaradier), nous avons choisi de prendre 10 arbres par porte-greffe des deux parcs.

Tableau 27. Les porte-greffes existant dans les parcs semenciers de Sbikha et d'El Gobba

Nom du porte-greffe	Nom latin	Effectifs des plants dans la collection de Sbikha	Effectifs des plants dans la collection d'El Gobba
Mandarinier Cléopâtre	<i>C. reshni</i> Hort. ex Tan.	10	55
Citrange Carrizo	<i>C. sinensis</i> (L.) Osb. x <i>P. trifoliata</i> (L.) Raf.	10	31
Bigaradier Gou Tou	<i>C. aurantium</i> L.	10	32
Volkameriana	<i>C. limonia</i> Osbeck	10	66
Macrophylla	<i>C. macrophylla</i> Wester	10	0
Citrange Troyer	<i>C. sinensis</i> (L.) Osb. x <i>P. trifoliata</i> (L.) Raf.	10	63
Rough Lemon	<i>C. jambhiri</i> Lush.	10	66
Bigaradier (tunisien)	<i>C. aurantium</i> L.	10	132
Citrumello Swingle	<i>C. paradisi</i> Macf. x <i>P. trifoliata</i> (L.) Raf.	0	32
Total		80	477

Les arbres portant un même nom d'accension sont considérés identiques et d'origine clonale. Toutefois, l'introduction des différentes accessions de la collection de Sbikha est faite par semis à partir de graines provenant de Turquie (Université de Cukurova ; Adana) ou de Corse (INRA/CIRAD ; San Giuliano). Des greffons ont été prélevés sur différents plants de semis de chaque accession et greffés sur bigaradier avant de passer en plein champ. Ce choix de greffage a été fait afin d'accélérer l'entrée en production, facilitée par le bigaradier, et d'éviter les problèmes de sensibilité à la salinité / calcaire du sol, sachant que le bigaradier est connu pour sa tolérance relative à ces facteurs. Ainsi les arbres portant une même référence de collection peuvent être issus de différents plants de semis. C'est pourquoi nous avons analysé tous les individus du parc semencier de Sbikha.

Le parc semencier d'El Gobba comporte des porte-greffes provenant de Corse (INRA/CIRAD ; San Giuliano) issus de semis pour la plupart. Certains sont greffés sur bigaradier.

2-1-2- Collection de travail de L'INRAT

Des prélèvements ont également été faits sur la parcelle collection de porte-greffes destinée à la recherche de l'INRAT (El Gobba) (Tableau 28).

L'origine du matériel de cette collection est multiple: l'Espagne (IVIA) pour Citrange Carrizo, la collection de Mr Lasram à Soukra pour le Citrange Troyer, et l'INRAT pour le reste des porte-greffes.

Tableau 28. Les porte-greffes analysés de la collection de l'INRAT - El Gobba

Nom du porte-greffe	Nom latin	Effectifs des plants
Mandarinier Cléopâtre	<i>C. reshni</i> Hort. ex Tan.	4
Citrange Carrizo	<i>C. sinensis</i> (L.) Osb. x <i>P. trifoliata</i> (L.) Raf.	6
Volkameriana	<i>C. limonia</i> Osbeck	3
Macrophylla	<i>C. macrophylla</i> Wester	4
Citrange Troyer	<i>C. sinensis</i> (L.) Osb. x <i>P. trifoliata</i> (L.) Raf.	8
Poncirus Flying Dragon	<i>P. trifoliata</i> (L.) Raf.	2
Total		27

Les génotypes de porte-greffes de Corse qui ont été envoyés en Tunisie pour la création des parcs semenciers ont servi de témoins pour le contrôle de la conformité génétique des accessions en collection en Tunisie (Tableau 29). Pour chaque accession des collections tunisiennes, plusieurs accessions de Corse ont été analysées. En effet sous une même dénomination commune (ex : rough lemon) plusieurs accessions peuvent être présentes dans la collection de Corse, et la traçabilité de l'accession introduite en Tunisie est parfois manquante.

Tableau 29. Les porte-greffes témoins de Corse

Nom du porte-greffe	Nom latin	Référence
1- Bigaradier Granito	<i>C. aurantium</i> L.	ICVN 0110015
2- Bigaradier Maroc	<i>C. aurantium</i> L.	SRA 952
3- Bigaradier Gou Tou	<i>C. aurantium</i> L.	SRA 506
4- Citrange Carrizo	<i>C. sinensis</i> (L.) Osb. x <i>P. trifoliata</i> (L.) Raf.	SRA 796
5- Citrange Troyer	<i>C. sinensis</i> (L.) Osb. x <i>P. trifoliata</i> (L.) Raf.	ICVN 0100981
6- Citrange C35	<i>C. sinensis</i> (L.) Osb. x <i>P. trifoliata</i> (L.) Raf.	SRA 731
7- Citrumello 1452	<i>C. paradisi</i> Macf. x <i>P. trifoliata</i> (L.) Raf.	ICVN 0110282
8- Citrumello 4475	<i>C. paradisi</i> Macf. x <i>P. trifoliata</i> (L.) Raf.	SRA 928
9- Citrumello Sacaton	<i>C. paradisi</i> Macf. x <i>P. trifoliata</i> (L.) Raf.	ICVN 0100843
10- <i>Macrophylla</i>	<i>C. macrophylla</i> Wester	SRA 779
11- <i>Volkameriana</i>	<i>C. limonia</i> Osbeck	SRA 729

12- Lime Rangpour Jaune	<i>Citrus limonia</i> Osbeck	ICVN 0110052
13- Lime Rangpour Red	<i>Citrus limonia</i> Osbeck	ICVN 0110053
14- Mandarinier Cléopâtre	<i>C. reshni</i> Hort. ex Tan.	SRA 948
15- Mandarinier Sunki	<i>C. sunki</i> Hort. ex Tan.	ICVN 0110076
16- Poncirus Flying Dragon	<i>P. trifoliata</i> (L.) Raf.	SRA 716
17- Poncirus Kryder SG	<i>P. trifoliata</i> (L.) Raf.	ICVN 0110108
18- Poncirus Pomeroy	<i>P. trifoliata</i> (L.) Raf.	SRA 1074
19- Poncirus Rubidoux	<i>P. trifoliata</i> (L.) Raf.	ICVN0110128
20- Rough Lemon Red	<i>C. jambhiri</i> Lush.	SRA 778

2-2- Méthodologie

2-2-1- Extraction d'ADN

Les ADNs totaux des porte-greffes des collections tunisiennes ont été extraits à partir de feuilles broyées en présence d'azote liquide, en utilisant le Quiagen DNeasy™ Plant Mini Kit. Ceux des témoins de Corse ont été extraits à partir de feuilles broyées aussi en présence d'azote liquide mais selon le protocole MATAB modifié (Risterucci *et al.*, 2000) (voir chapitre I. Paragraphe 2-2-1). La quantification des extraits d'ADN total obtenus est réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 0.8% dans du tampon Tris-Acétate 1x (TAE1x). Deux µl de l'ADN total extrait sont additionnés de 1 µl de bleu de charge (10x) et 8 µl d'eau déminéralisée, puis déposés dans le gel. Après électrophorèse du gel durant 45 min à 120V, ce dernier est placé dans un bain de bromure d'éthidium (10µg/ml) durant 15 min puis il est visualisé sous UV.

La quantification de nos échantillons est faite en présence de marqueurs sous forme d'ADN témoins, soit 3 échantillons de quantités d'ADN connues : T40 (40 ng/µl), T100 (100 ng/µl) et T160 (160 ng/µl).

2-2-2- Détermination de la ploïdie des individus par cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet l'évaluation de la ploïdie, par estimation de la quantité d'acide nucléique contenue dans le noyau des cellules des tissus foliaires. Au moyen d'un cytomètre en flux (type Partec PA), la quantité d'ADN génomique par noyau de chacun des individus a été évaluée. Le kumquat a été utilisé comme témoin interne diploïde. L'utilisation d'un fluorochrome spécifique de la paire de base A-T (le 4'-6-diamino-2-phenylindole, DAPI), se

fixant à l'extérieur de la double hélice de l'ADN, permet de mesurer la fluorescence relative de l'ADN nucléaire total pour chaque noyau coloré. Les résultats se présentent sous forme d'histogramme où la moyenne d'un pic est proportionnelle au contenu en ADN des noyaux correspondant à ce pic. Pour l'analyse, 0.5 cm² de chaque feuille échantillonnée sont broyés dans 250 µl de tampon d'extraction (Partec), permettant ainsi de libérer les noyaux des cellules dans le tampon, puis passés sur filtre à 20µm. le filtrat obtenu est mélangé à 400µl de fluorochrome DAPI homogénéisé, puis passé au détecteur.

2-3- Choix des amorces microsatellites

Les SSRs sont des marqueurs co-dominants parfaitement adaptés à la différenciation de plantes d'origine sexuée ou somatique. Treize marqueurs microsatellites ont été utilisés : 7 loci microsatellites ont été choisis à partir de banques génomiques développées par Froelicher *et al.* (2008) et 6 loci microsatellites proviennent de base de données EST développées par Luro *et al.* (2008) (Tableau 30). Ils ont été sélectionnés pour leur taux de polymorphisme sur l'échantillon génétique considéré et pour la qualité de leurs profils.

Tableau 30. Les amorces microsatellites utilisées, leurs séquences et températures d'hybridation respectives.

Locus	Upper 5'-->3'	Lower 5'-->3'	T°C hybridation
Ci03C08	CAGAGACAGCCAAGAGA	GCTTCTTACATTCTCTCAA	55
CI02D09	AATGATGAGGGTAAAGATG	ACCCATCACAAAACAGA	55
CI02D04B	CTCTCTTTCCCCATTAGA	AGCAAACCCCACAAC	50
CI02G12	AAACCGAAATACAAGAGTG	TCCACAAACAATACAACG	55
CI02A09	ACAGAAGGTAGTATTTTAGGG	TTGTTTGGATGGGAAG	50
Ci03D12a	GCCATAAGCCCTTTCT	CCCACAACCATCACC	50
Ci03G05	CCACACAGGCAGACA	CCTTGGAGGAGCTTTAC	50
MEST458	CCCCCTCTTTTTCTCTTCCA	TTCTGGGCTGGTAGGTTTCA	55
MEST830	TTCATGGCAGCTTGAGTTTC	TTGGTTTCTTTGGGGATCA	55
MEST338	TTTCTAAAATTTCTTCATGGC	CAGGTGAAATCTCATCGCCT	55
MEST817	CCCAGCTTCCAGAGAAGAGA	GTCAAGAATCAAGCAGGCGT	55
MEST121	TCCCTATCATCGGCAACTTC	CAATAATGTTAGGCTGGATGGA	55
MEST431	GAGCTCAAAACAATAGCCGC	CATACCTCCCCGTCCATCTA	55

2-4- Amplification de l'ADN par PCR et analyse des loci microsatellites par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) dénaturant

Les ADN des accessions collectées ont été amplifiés par PCR à l'aide des 13 amorces microsatellites polymorphes marquées radioactivement (voir chapitre I. Paragraphe 2-2-2-3).

2-5- Analyse des données

L'observation des profils de migration a permis de repérer un ou deux allèles par locus et par individu analysé.

La taille des allèles à chaque locus a été déterminée sur base du Ladder 10 pb, puis on a comparé les résultats à ceux obtenus par l'équipe de Corse pour un certain nombre de références.

Ces contrôles qui ont servi de référence de taille sont : Bigaradier Maroc, *Citrus macrophylla*, Mandarinier Cléopâtre, Mandarinier Sunki, Poncirus Pomeroy.

La lecture visuelle des gels a permis d'identifier les allèles à chaque locus marqueur, un numéro est attribué à chaque allèle, et une matrice de variables est établie illustrant les génotypes des individus à chaque locus. Au total 10 marqueurs ont été sélectionnés parmi 13 analysés. Ces marqueurs ont été sélectionnés parce qu'ils ont généré des profils lisibles, interprétables et pour la plupart polymorphes. Les 3 marqueurs non sélectionnés sont des microsatellites inclus dans des EST (MEST 817, MEST 338, MEST 830), et ont généré des profils avec plus de 3 bandes, suggérant un manque de spécificité de ces marqueurs ou une nécessité d'optimisation des conditions PCR.

Si on considère les notations alléliques (les allèles de chaque marqueur ont été numérotés du plus grand au plus petit), l'analyse a été faite avec l'indice 'simple matching' selon la formule:

$$d_{ij} = 1 - \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L \frac{m_l}{\pi}$$

où d_{ij} : dissimilarité entre les individus i and j

L : nombre de locus

π : ploïdie

m_l : nombre d'allèles assortis pour le locus l

Une représentation arborée de la diversité (dendrogramme) est ensuite construite à partir de la matrice des dissimilarités en utilisant la méthode du Neighbor joining (Seitou et Nei, 1987), qui utilise le critère de voisinage relatif à i et j (déclarant les éléments i et j comme voisins quand la dissimilarité entre i et j est la plus faible). L'ensemble de cette analyse est réalisé à l'aide du programme informatique Darwin® (Perrier *et al.* 2003).

III- Résultats et discussion

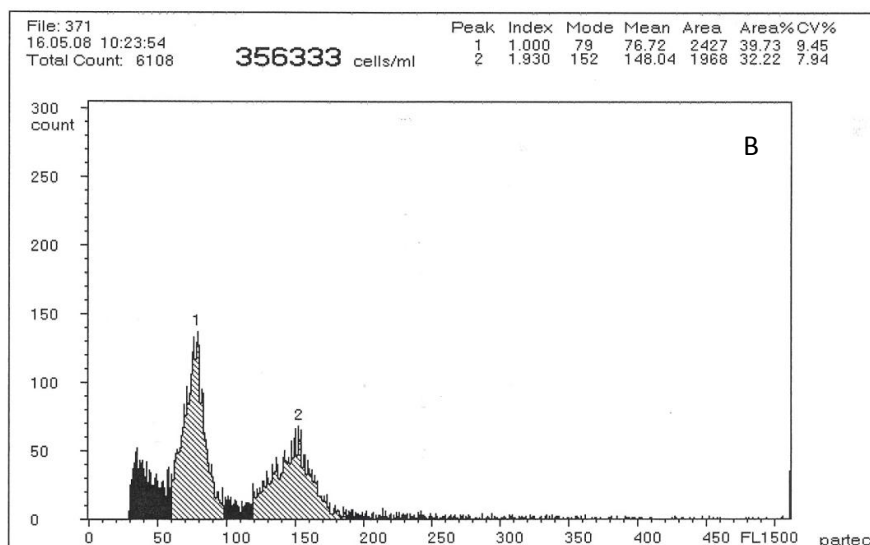
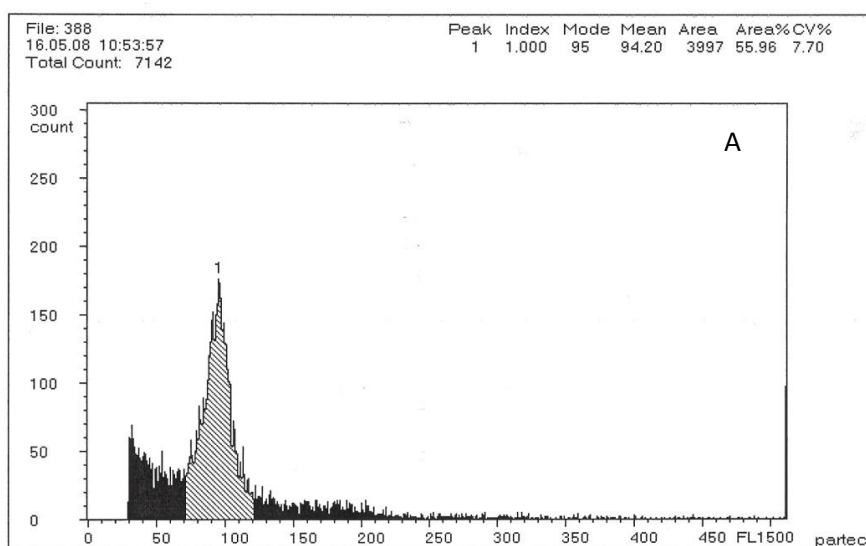
3-1- Détermination de la ploïdie des porte-greffes

La majorité des échantillons se sont avérés diploïdes (Tableau 31). Un arbre considéré comme un Citrange Carrizo était triploïde et 2 supposés être des Citranges Troyer étaient tétraploïdes (Figure 26).

Les tétraploïdes obtenus dans les semis de porte-greffes devraient être étudiés afin de dévoiler leurs performances agronomiques en tant que porte-greffe, particulièrement sous des conditions de stress salin et hydrique. Des travaux récents sur des porte-greffes tétraploïdes ont suggéré qu'ils ont une meilleure tolérance au stress hydrique et salin que leurs parents diploïdes (Saleh *et al.*, 2008), probablement à cause d'une synthèse modifiée d'acide abscissique (Allario, 2009). La sélection de diploïde-doublés peut constituer une approche prometteuse pour l'amélioration de la tolérance à certains stress abiotiques, sans modifier la constitution allélique, et avec une forte probabilité de transmission des caractères liés à la résistance aux maladies. Quelques lignées tétraploïdes ont récemment été sélectionnées représentant des bigaradiers, la mandarine 'Cléopâtre', le *Poncirus* 'Pomeroy' et les citranges 'Carrizo', 'Troyer' et C35 (Aleza *et al.*, 2011). Dans le future, un changement spectaculaire de l'agrumiculture pourrait être le passage de la culture d'agrumes diploïdes à celle de polyploïdes. En effet, en parallèle des études conduites sur les porte-greffes tétraploïdes de nombreux projets d'amélioration des variétés visent le développement d'arbres triploïdes produisant des fruits sans pépins. Les génotypes tétraploïdes identifiés dans les semis de diploïdes pourraient donc jouer un rôle important dans l'évolution des formes cultivées comme parents pour les croisements interploïdes ou directement comme de nouveaux porte-greffes.

Tableau 31. Résultats du niveau de ploïdie des porte-greffes des collections

Porte-greffe	Niveau de ploïdie	Origine
Bigaradier Gou Tou	Tous 2X	Sbikha et El Gobba
Citrange Carrizo	Tous 2X sauf l'accession N°4 de Sbikha qui est triploïde (3X)	Sbikha et El Gobba
<i>Citrus macrophylla</i>	Tous 2X	Sbikha et El Gobba
Bigaradier	Tous 2X	Sbikha et El Gobba
Citrange Troyer	Tous 2X sauf les 2 accessions N°3 et 8 d'El Gobba qui sont tétraploïdes (4X)	Sbikha et El Gobba
Mandarinier Cléopâtre	Tous 2X	Sbikha et El Gobba
Rough lemon	Tous 2X	Sbikha et El Gobba
<i>Citrus volkameriana</i>	Tous 2X	Sbikha et El Gobba



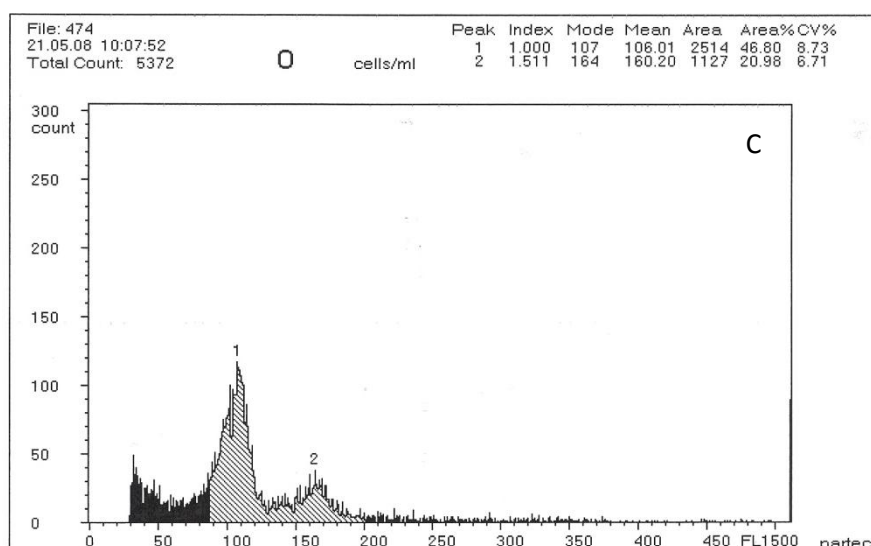


Figure 26. Histogrammes montrant la mesure de la ploïdie de quelques porte-greffes des collections. A. Bigaradier Gou Tou (BG4) d'El Gobba, diploïde. B. Citrange Troyer (CT3) d'El Gobba, tétraploïde. C. Citrange Carrizo (CC4) de Sbikha, triploïde.

3-2- Diversité observée des porte-greffes analysés

Les marqueurs microsatellites ont généré de 4 à 11 allèles, avec un nombre moyen d'allèles plus faible pour les marqueurs développés à partir d'EST (MEST) (Tableau 32).

Tableau 32. Nombre d'allèles des marqueurs SSRs et gamme de taille des amplicons analysés

Microsatellite ID	Nombre d'allèles	Taille des amplicons (pb)
CI02A09	9	150-176
Ci03C08	10	200-250
CI02D04B	11	170-240
CI02D09	10	222-252
Ci03D12a	10	236-274
Ci03G05	11	208-232
CI02G12	11	224-262
MEST121	5	176-200
MEST431	4	334-346
MEST458	7	208-240

Les analyses ont révélé plusieurs groupes plus ou moins homogènes (Fig. 27):

- ✓ Groupe des citronniers/limetiers, comportant les espèces *Citrus macrophylla*, *volkameriana*, Rough lemon, Lime rangpur.
- ✓ Groupe des mandariniers, regroupant les Mandariniers Cléopâtre et Mandarinier Sunki.
- ✓ Groupe des *Poncirus trifoliata*, regroupant les variétés *Poncirus* Krider, *Poncirus* Flying Dragon et *Poncirus* Rubidoux.
- ✓ Groupe des Citrumellos représenté par Citrumello 1452, Citrumello 4475 et Citrumello Sacaton.
- ✓ Groupe des Citranges divisé en Citrange Carrizo, C35 et Citrange Troyer
- ✓ Groupe des Bigaradiers représenté par les Bigaradiers, Granito, Maroc et les Bigaradiers Gou Tou.

3-3- Conformité et homogénéité

Cette étude a permis de vérifier la conformité des porte-greffes dans les 3 collections et d'expliquer les problèmes de non-conformité (Tableau 33).

Tous les arbres de Rough lemon sont identiques et conformes avec le témoin de Corse.

Tous les Citranges Troyer de Sbikha (10) sont identiques et conformes au témoin CT de Corse. Cependant 3 Citranges Troyer sur 10 du parc semencier d'El Gobba et tous les Citrange Troyer de la collection de l'INRAT sont différents de la référence Corse.

Les Citranges Carrizo sont moins homogènes que les Citranges Troyer. En effet 9 arbres sur 10 de Sbikha et seulement 2 arbres sur 10 du parc semencier d'El Gobba sont identiques et conformes au témoin de Corse.

Parmi les citranges non conformes 6 supposés être des Citranges Carrizo (G52, G53, G54, G56, G57 et G59) et 3 Citranges Troyer d'El Gobba (G5, G6 et G7) se trouvent regroupés avec les bigaradiers. Le parc à bois étant établi sur bigaradier, ceci suggère que le porte-greffe a pris le dessus sur le Citrange greffé.

Un Citrange Carrizo (G60) du parc semencier d'El Gobba est identique au Citrange Troyer de référence. De même les Citranges Carrizo de la collection de l'INRAT (I1 jusqu'à I6) sont identiques aux Citrange Troyer de la même collection (I8 jusqu'à I15). Il apparaît clairement

là qu'il s'agit de problèmes d'identification durant l'introduction du matériel ou la mise en place de la collection.

Un autre Citrange Carrizo toujours du parc semencier d'EL Gobba (G58), se différencie du groupe des citranges, on peut supposer que cet individu est d'origine sexuée. Le Citrange Carrizo de Sbikha (N°6) se retrouve quant à lui isolé dans le groupe des *volkameriana*, ce qui indique un problème d'identification du matériel.

Ainsi, bien que les citranges Carrizo et Troyer constituent des groupes proches, il apparaît que la plupart des citranges des collections de Tunisie ne correspondent pas aux témoins de la collection de Corse. Il est donc essentiel d'éliminer les citranges non conformes des parcs semenciers et de la collection de l'INRAT.

Tableau 33. Récapitulation des situations de non-conformité des porte-greffes analysés

	Parc de Sbikha	Parc d'El Gobba	Collection INRAT
Reprise du porte-greffe bigaradier	44 : mandarinier Cléopâtre	G5 } Citrange G6 } Troyer G7 } G52 } G53 } Citrange G54 } Carrizo G56 } G57 } G59 } G72 : <i>C. Volkameriana</i>	
Mélange, erreur d'identification, doute sur le porte-greffe et besoin d'identification morphologique	6 : Citrange Carrizo (dans le groupe des Volkameriana) 21 } <i>C. macrophylla</i> 25 } différents des autres, plus proches des <i>C.</i> <i>volkameriana</i> 34 } <i>C. volkameriana</i> 35 } plus proches de 37 } <i>C. macrophylla</i> 38 } de Corse que de 39 } leur témoin 40 }	G60 : Citrange Carrizo (dans le groupe des <i>C.</i> Troyer) G16 } G18 } Bigaradier G19 } G72 : <i>C. Volkameriana</i> proche des bigaradiers, peut-être greffé sur un bigaradier différent des autres de la collection <i>C. volkameriana</i> G78 } identiques aux G80 } Rough lemon de la même collection et au témoin de Corse RL G79: <i>C. volkameriana</i> différent des autres de la collection	I1 } Citranges I2 } Carrizo I3 } (identiques I4 } aux <i>C. Troyer</i>) I5 } I6 } I26 } Mandariniers I27 } Cléopâtre I28 } proches des I29 } autres mandariniers I23 } <i>Poncirus</i> I24 } <i>trifoliata</i> très différents <i>C.</i> I16 } <i>macrophylla</i> I18 } ne ressemblant I19 } à aucun porte- greffe I20 : <i>C. Volkameriana</i> proche de ceux d'El Gobba I 21 et I22: <i>C.</i> <i>Volkameriana</i> proches des limes ranpur jaune et rouge
Individus susceptibles d'être d'origine sexuée	21 } <i>C.</i> 25 } <i>macrophylla</i>	G58 : Citrange Carrizo	I26 } Mandariniers I27 } Cléopâtre I28 } I29 }

Le groupe des Bigaradiers est assez homogène et les porte-greffes des collections tunisiennes sont pour la plupart conformes aux témoins de Corse : Bigaradiers Maroc et Granito, qui présentent les mêmes profils avec les marqueurs choisis.

Cependant, trois bigaradiers d'El Gobba (G16, G18 et G19) sont identiques aux Bigaradiers Gou Tou, laissant supposer une erreur d'identification de départ.

Les mandariniers Cléopâtre, constituent un groupe bien homogène (à l'exception du n°44 identique à un bigaradier et résultant probablement d'un rejet du porte-greffe lors de la propagation par greffage du mandarinier Cléopâtre) aussi bien à El Gobba qu'à Sbikha. Tous ces arbres sont identiques au témoin de Corse. Les mandariniers Cléopâtre de la collection de l'INRAT (I26 jusqu'à I29) sont proches mais non identiques à ce groupe. Pour les marqueurs analysés, le niveau de différenciation réside dans un allèle en 2DO4B qu'on retrouve chez ces mandariniers de l'INRAT et pas chez la référence de Corse. Par contre cet allèle se trouve chez le mandarinier Sunki. Par ailleurs, en 3D12a chez le mandarinier I29 on a remarqué la fixation à l'état homozygote d'allèles appartenant à la référence (hétérozygote). Ceci laisse supposer que les mandariniers de la collection de l'INRAT sont apparentés aux mandariniers du groupe El Gobba- Sbikha, mais d'origine sexuée.

Les citrumellos du parc semencier d'El Gobba sont tous identiques mais différents des citrumellos de Corse. Le citrumello 4475 étant le plus proche des arbres de la collection. Ceci dit, tous les citrumellos analysés forment un groupe homogène.

Les *Poncirus* analysés forment un cluster bien différencié. Les *Poncirus* Krider et Pomeroy se sont montrés identiques alors que l'ensemble des autres arbres son différents. Ainsi, les deux *Poncirus trifoliata* cv. Flying Dragon de la collection de l'INRAT El Gobba ne sont pas homogènes.

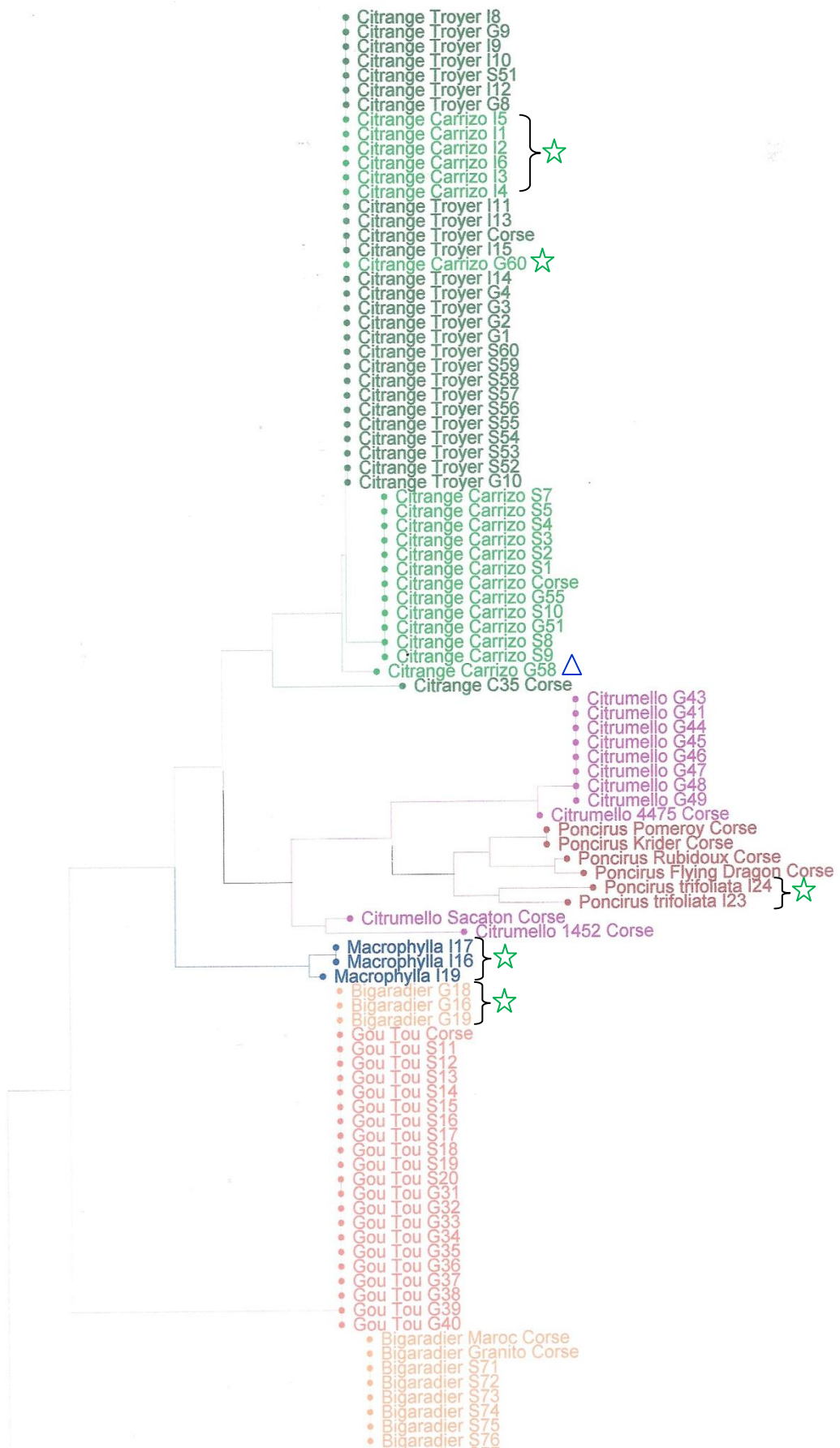
Deux porte-greffes ont présenté énormément de variations dans les collections tunisiennes par rapport aux références Corse. Ce sont *Citrus macrophylla* et surtout *C. volkameriana*. La méthode NJTree (pour Neighbor-Joining) est souvent utilisée en diversité génétique (Perrier *et al.*, 1999). L'utilisation du critère de voisinage relatif qui met à jour les dissimilarités et les ajuste à une distance additive d'arbre, fait que cette méthode est très efficace pour retrouver l'arbre vrai. Sur l'analyse Neighbor-Joining basée sur la matrice des données alléliques pour les 10 marqueurs microsatellites, les arbres des collections tunisiennes sont dispersés dans le

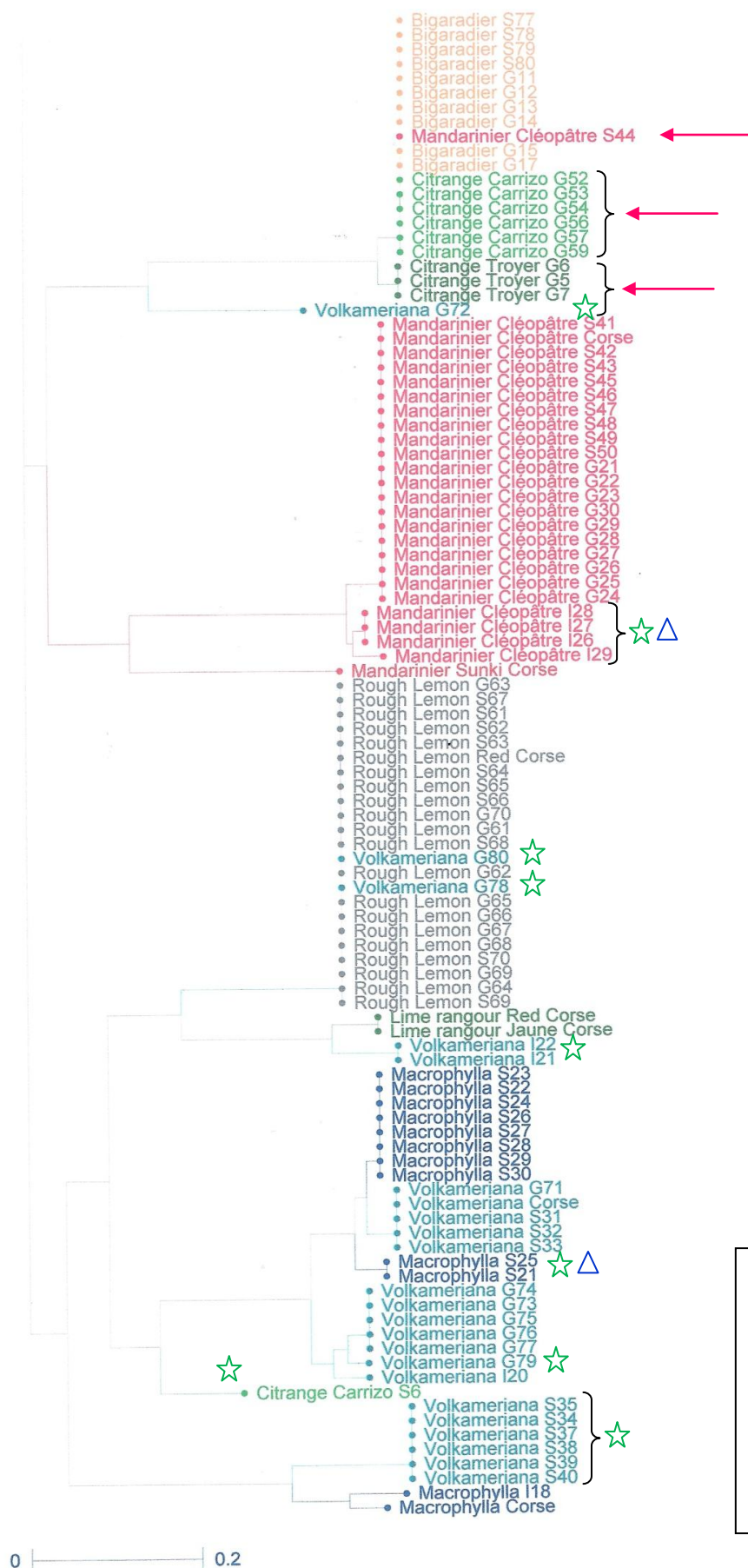
groupe des citronniers, révélant pour tous des problèmes de traçabilité ou d'origine sexuée (Fig. 27-29).

Huit *C. macrophylla* sur 10 de Sbikha (N°22, 23, 24, 26, 27, 28, 29 et 30) sont identiques mais aucun des 10 ne ressemble au témoin de Corse très éloigné sur l'analyse NJ. Les *C. macrophylla* de la collection de l'INRAT sont différents des *C. macrophylla* des deux autres collections tunisiennes et de la référence Corse. I16 et I17 sont identiques mais différents de I19. I18 est le seul *macrophylla* de cette collection qui est proche de la référence Corse. Ces individus sont placés de façon aberrante sur l'arbre, nécessitant plus de données pour essayer de définir leur nature exacte.

Les arbres de *C. volkameriana* des collections tunisiennes sont hétérogènes (figure 27 et 28). Bien que certains d'entre eux sont identiques: seulement 5 sur 10 (G73 jusqu'à G77) du parc semencier d'El Gobba et 6 arbres sur 10 (34, 35, 37, 38, 39, 40) du parc de Sbikha, ces porte-greffes sont proches mais non conformes à la référence Corse. Ces derniers du parc de Sbikha sont beaucoup plus proches du témoin de Corse des *C. macrophylla* que de leur témoin spécifique. Il est probable que ces arbres sont issus d'un plant de semis zygotique de *C. macrophylla*. Un *C. volkameriana* d'El Gobba (G72) est complètement différent des autres *C. volkameriana*, il est aussi placé de façon aberrante à côté du groupe des bigaradiers. Comme précédemment il s'agit sans doute d'un porte-greffe qui prend le dessus sur le greffon et que l'on peut supposer être un plant zygotique de bigaradier.

Seulement quatre *C. volkameriana* (31, 32 et 33) de Sbikha et un (G71) d'El Gobba sont identiques au témoin de Corse (Figure 27).





→ : Accession faisant objet de reprise du porte-greffe bigaradier

☆ : Accession faisant objet d'un mélange, erreur d'identification, doute sur le porte-greffe

△ : Individus susceptibles d'être d'origine sexuée

Figure 27. Arbre de dissimilarités génétiques des porte-greffes des collections tunisiennes et des témoins de Corse. "S" et "G" désignent les noms des accessions de la collection de Sbikha et d'El Gobba, respectivement.

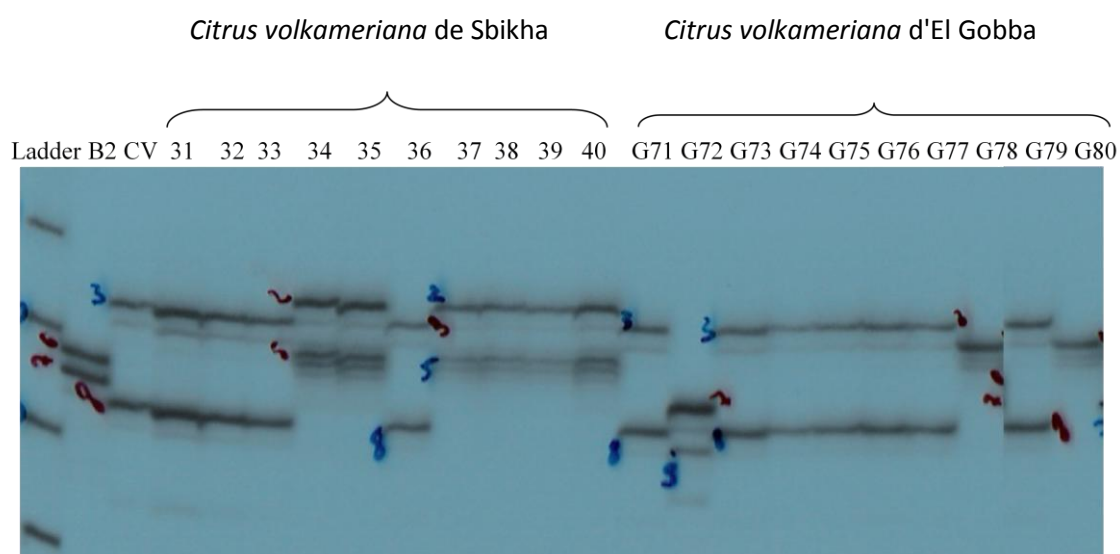
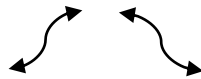


Figure 28. Les accessions de *Citrus volkameriana* analysées avec le marqueur microsatellite *CI02A09*. CV: *Citrus Volkameriana* de Corse. B2: Bigaradier de Corse contrôle de la collection tunisienne

D'une manière générale l'hétérogénéité observée au sein de certaines accessions et la non conformité par rapport aux génotypes de la collection de Corse peuvent s'expliquer par (i) des problèmes de traçabilité lors de l'introduction des accessions ou l'installation des parcelles de collection, (ii) la mort du greffon et la reprise du porte greffe pour certains arbres de collection, (iii) la présence de plants d'origine zygotique résultant d'une introduction par graines.



C. volkameriana



C. macrophylla

Figure 29. Fruits produits par des arbres d'origine douteuse de *C. volkameriana* et *C. macrophylla*

L'impact pratique de ce travail est d'aider à la gestion des collections tunisiennes de porte-greffes qui sont distribués aux pépiniéristes et aux agriculteurs. Plusieurs mesures doivent être prises afin de pallier aux problèmes de non-conformité des porte-greffes à partir des collections analysées:

- systématiser la vérification de la conformité génétique des parcs semenciers existant et des futurs parcs,
- éliminer les individus triploïdes et tétraploïdes et re-greffer tous les individus qui ont présenté des reprises du bigaradier,
- confirmer l'identité exacte et l'homogénéité du matériel distribué, ce qui offre une garantie de propagation d'un bon matériel loin des mélanges, des erreurs d'étiquetage et des plants qui sont soupçonnés d'origine sexuée.
- Par ailleurs, il est nécessaire d'éliminer tous les plants douteux, et de refaire toutes les séries de porte-greffes nécessaires à partir de nouvelles introductions (*C. volkameriana* et *C. macrophylla*).

En aval de ce travail, un rapport contenant les résultats des analyses des collections et les recommandations nécessaires a été distribué aux responsables des stations pour concrétiser cette contribution à la gestion des ressources génétiques tunisiennes.

Des observations morphologiques complémentaires nécessaires à l'interprétation des analyses ont pu être réalisées à Sbikha. D'ores et déjà des informations utiles à la gestion des ressources génétiques et des parcs à bois ont pu être apportées au niveau du GIFruits, en particulier à Sbikha où quelques problèmes de conformité pourront être résolus simplement (surgreffage d'un arbre, élimination des *Citrus volkameriana* non conformes au type d'origine).

A court terme, le contrôle de la conformité génétique des collections de porte-greffes, offrira une garantie sur les arbres-mères des schémas de multiplication des porte-greffes. Cette garantie assurera la conformité du matériel planté et l'homogénéité du comportement agronomique.

DISCUSSIONS GÉNÉRALES, CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

Se donner du mal pour les petites choses, c'est parvenir aux grandes, avec le temps.

Samuel Beckett

Les ressources génétiques traditionnelles sont importantes pour répondre aux enjeux de l'agrumiculture méditerranéenne

L'agrumiculture reste un secteur économique important dans la région méditerranéenne. La production agrumicole méditerranéenne doit répondre à plusieurs enjeux, dont la diversification de la production, l'amélioration de la qualité et la disponibilité de l'eau. La diversification de la production agrumicole doit être considérée comme le point de départ de toute action visant à changer la réalité actuelle de l'agrumiculture méditerranéenne. En Italie, en Turquie, au Maroc, en Tunisie, en France, en Espagne, etc. les agriculteurs cultivent tous plus ou moins les mêmes produits. L'engorgement du marché est inévitable et conduit à certaines périodes de l'année à un effondrement des prix très préjudiciable aux producteurs qui doivent donc s'efforcer de diversifier leur production afin, en particulier, d'étendre la période de production et de limiter la concurrence. Le deuxième élément essentiel à la mise en marché, étroitement lié au premier, est celui de la qualité des produits. La qualité résulte de multiples facteurs, dont deux qui sont particulièrement importants: les normes sanitaires et les productions spécifiques du terroir. La spécificité organoleptique permet de mettre en valeur les productions régionales de chaque pays. Tout produit, en effet, diffère d'une région à l'autre selon la nature du sol, le climat et les techniques de production, qui varient en fonction des traditions et de la culture. Des variétés typiques de certains bassins de production comme la maltaise demi-sanguine pour la Tunisie assurent cette différenciation des produits. Le choix des porte-greffes est également essentiel dans l'élaboration de la qualité et répond également souvent à des pratiques traditionnelles. Certains label d'origine (AOC, IGP) sont des garants d'une certaine qualité en certifiant le respect de la culture et de la tradition d'une région donnée. Par ailleurs, devant les incertitudes actuelles sur la pluviométrie, la disponibilité des eaux d'irrigation et le bilan hydrique, il est nécessaire de se préoccuper du choix du matériel végétal adapté (porte-greffe et variété).

Le choix fait par les agriculteurs de cultiver de nouvelles variétés est souvent motivé entre autres par la demande des marchés, les variations de l'environnement et la durabilité des productions. Malheureusement, ces choix entraînent souvent une érosion génétique importante au niveau des bassins de production. Cette érosion constitue sur le long terme un risque important dans un contexte où le changement climatique global implique la sélection de matériel végétal adapté à un environnement de plus en plus contraignant. Le porte-greffe constitue un élément essentiel dans cette recherche d'une meilleure adaptation aux contraintes

abiotiques. Les diverses espèces locales et surtout traditionnelles et la diversité qu'elles renferment jouent un rôle primordial dans le développement économique, social et culturel. Les ressources génétiques locales demeurent la matière première la plus importante pour le sélectionneur et l'améliorateur. De ce fait, les institutions de recherche doivent adopter de nouvelles stratégies de recherche avec le développement agricole sous un angle nouveau pour conserver la diversité biologique, améliorer les cultures et assurer une production de qualité. C'est dans cet esprit que les connaissances autochtones et la biodiversité devraient être prises d'avantage en compte par un travail des scientifiques en collaboration avec les agriculteurs pour renforcer et soutenir les stratégies rurales de sélection et d'amélioration variétale mais également intégrer les savoirs et variétés traditionnelles dans les projets d'amélioration des organismes de recherche-développement.

Cette thèse s'inscrit dans cette dynamique par l'analyse de la diversité génétique et de l'origine de cette diversité au sein des ressources génétiques traditionnelles des porte-greffes d'agrumes en Tunisie. La Tunisie, présente une diversité importante des conditions environnementales des régions de production avec des contraintes particulièrement élevées dans les oasis du Sud. Cette variabilité de l'environnement et la très ancienne tradition de culture des agrumes en font une région privilégiée où chercher de la diversité génétique adaptative au sein des porte-greffes traditionnels résultant d'un long processus de sélection. La présente thèse a confirmé la prédominance du porte-greffe bigaradier en Tunisie. Il est retrouvé dans presque toutes les régions productrices d'agrumes, est bien adapté aux conditions environnementales et est indemne de maladies et ravageurs nuisibles graves. Les pépiniéristes ainsi que les producteurs ont une longue expérience dans la propagation des agrumes. Ainsi, les variétés de bigaradier sont bien connues et les plants, issus d'embryons nucellaires (apomixie), aux phénotypes standards sont diffusés par les professionnels dans toutes les régions concernées du pays. La prospection a révélé qu'en plus du bigaradier, les citrons et limes représentent d'autres espèces traditionnellement utilisées comme arbres franc de pied ou comme porte-greffes, principalement dans le sud tunisien, où la pluviométrie est seulement de 120 à 200 mm par an et la plupart des eaux d'irrigation est saumâtre (eau provenant de zones aquifères salines qui n'est pas propre à la consommation ou à l'usage en agriculture). Dans ces régions, l'eau d'irrigation (puit ou forage) peut contenir jusqu'à 4-7 g/l de sel, particulièrement en été. Ces porte-greffes sont très bien adaptés aux conditions environnementales locales et donnent des fruits très parfumés. Ils sont propagés végétativement par marcottage, permettant d'assurer une multiplication conforme.

Les données moléculaires témoignent d'une structuration très forte de la diversité du germoplasme tunisien organisée autour des groupes variétaux en lien direct avec la différenciation des taxons ancestraux et l'origine des formes cultivées

Deux cent une accessions tunisiennes appartenant à 4 espèces apomictiques facultatives (*C. aurantium*, *C. sinensis*, *C. limon* et *C. aurantifolia*) ainsi qu'un jeu de 23 accessions de référence (provenant de la collection de Corse), représentatives de la diversité globale des espèces rencontrées en Tunisie, ont été génotypés avec vingt marqueurs SSRs nucléaires et 4 InDel mitochondriaux. Cette analyse a permis d'identifier seize génotypes multilocus (MLGs) distincts au sein du germoplasme tunisien, dont 10 représentatifs des bigaradiers. Toutefois, la majorité des bigaradiers correspondent à 2 MLGs, différenciés par un seul allèle. La diversité variétale intra groupes variétaux est donc apparue relativement faible au sein du matériel prospecté. L'importante redondance génétique liée à la multiplication végétative et l'origine interspécifique des espèces secondaires se traduit par un niveau d'hétérozygotie élevé et supérieur à celui attendu selon l'équilibre d'Hardy-Weinberg, aussi bien pour l'échantillon entier que pour chaque groupe variétal (bigarade, orange douce, citron et lime). En revanche, l'analyse des index de fixation de Wright (F_{IT} , F_{IS} négatifs et F_{ST} positif) en considérant les groupes variétaux comme sous populations révèle une forte structuration entre groupes variétaux en cohérence avec la distribution des génotypes, révélées par les analyses multivariées et les classifications arborées. Ces résultats indiquent que, malgré une compatibilité sexuelle totale entre les groupes variétaux, les flux de gènes entre groupes mais aussi au sein des groupes sont restés très limités. Ainsi comme discuté plus loin, seul cinq bigaradiers seraient issus d'hybridation (ou autofécondation) intra *C. aurantium*, et deux d'hybridation interspécifique.

Pour les autres groupes variétaux un seul événement d'hybridation interspécifique ayant potentiellement eu lieu en Tunisie a été observé (*C. aurantifolia* x *C. medica*). Ainsi l'échantillon d'agrumes tunisien montre une structuration claire et robuste différenciant les quatre espèces étudiées (*C. aurantium*, *C. sinensis*, *C. limon* et *C. aurantifolia*) et présente un regroupement totalement cohérent avec les accessions de référence de ces mêmes espèces provenant de la collection INRA/CIRAD de Corse. Ce regroupement majoritaire des MLGs tunisiens avec les génotypes de référence a été confirmé par l'analyse des séquences de six gènes candidats pour la tolérance à la salinité sur les 16 MLGs Tunisiens et 37 accessions des

collections de Corse et de l'IVIA représentatives des *Citrus*, incluant les taxons ancestraux (*C. maxima*, *C. medica*, *C. reticulata* et *C. micrantha*) et les cinq espèces secondaires qui en découlent (*C. aurantium*, *Citrus sinensis*, *Citrus limon*, *Citrus paradisi*, *Citrus aurantifolia*). Le faible polymorphisme moléculaire (SSR et SNP) observé au niveau intraspécifique au sein de *C. sinensis*, *C. aurantium* et *C. limon*, malgré leurs hétérozygoties élevées, conforte l'hypothèse que la plupart du polymorphisme intraspécifique de ces espèces secondaires résulte de mutations ponctuelles, de mouvement d'éléments transposables (Breto *et al.*, 2001) ou de variation épigénétique (Ollitrault *et al.*, 2012a). L'origine du polymorphisme intraspécifique des agrumes Tunisien est discutée en détail au point suivant.

Le séquençage de plus de 4 Kb correspondant à 6 fragments de gènes nucléaires pour les 54 génotypes mentionnés a conduit à l'identification de 121 SNPs. Ces marqueurs révèlent une forte différenciation entre les taxons de base. En effet la différenciation inter-taxon (F_{ST}) explique l'essentiel de la structuration globale (F_W), validant les subdivisions taxonomiques considérées et témoignant d'une limitation forte des flux de gènes entre ces pools géniques du genre *Citrus*. Un élément clef de cette limitation des flux de gènes entre groupes sexuellement compatibles est une évolution allopatrique : les mandariniers sont originaires du sud de la Chine et du Japon, Les cédratiers du nord-est de l'Inde et de Birmanie et les pamplemoussiers de Malaisie/Phillipine. Au-delà de la différenciation de marqueurs neutres, cette évolution allopatrique dans des environnements différents des différents taxons de base, a pu également conduire à des diversifications non synonymes.

Nos résultats confirment que les SNPs sont des outils efficaces pour la différenciation interspécifique, comme l'ont démontré Garcia-Lor *et al.* (2013) et Ollitrault *et al.* (2012a) qui concluaient à une meilleure efficacité de ces marqueurs que celle des SSRs pour les études phylogénétiques. Ainsi le polymorphisme SNP multilocus au sein de chaque gène nous a permis d'assigner une hérédité phylogénétique pour tous les MLGs tunisiens et pour les accessions de référence représentatives des espèces secondaires. Ces résultats, complétés par une étude de phylogénie maternelle basée sur des InDels mitochondriaux, confirment les conclusions de travaux antérieurs (Nicolosi *et al.* 2000 ; Garcia-Lor *et al.*, 2012; Ollitrault *et al.*, 2012b) concernant l'origine des espèces secondaires :

- L'oranger (*C. sinensis*) est issu d'hybridation entre les pools géniques *C. maxima* et *C. reticulata* et présente une structure en mosaïque interspécifique
- Le bigaradier pourrait résulter d'une hybridation directe (F1) entre *C. maxima* et *C. reticulata* et n'a pas d'apparentement direct avec l'oranger

- Le citronnier pourrait être un hybride de bigaradier et de cédratier. Il présente en effet pour tous les gènes un haplotype de type *C. medica* couplé suivant les gènes à un haplotype de type *C. reticulata* ou *C. maxima*. Il partage par ailleurs avec le bigaradier des allèles rares SNPs et SSRs.
- Le limettier mexicain serait un hybride direct entre *C. micrantha* et *C. medica* et les limettiers tunisiens présentent différentes origines qui sont discutées plus en détail au point suivant.

En raison de l'histoire de diversification des taxons secondaires, la plupart des conclusions sur la structure en mosaïque déduites à partir d'un ou de deux génotypes pourrait être étendue à un plus grand nombre de cultivars de la même espèce secondaire (Garcia-Lor *et al.*, 2013); nos résultats pour 6 gènes contribue donc à l'étude plus générale du décryptage de la mosaïque interspécifique des formes cultivées.

D'une manière générale, l'évaluation des relations génétiques que nous avons réalisée avec des marqueurs SSRs, SNPs et les InDel mitochondriaux nous a apportés des informations essentielles sur la structure de la diversité du germoplasme tunisien des porte-greffes d'agrumes. Ainsi, l'essentiel du polymorphisme moléculaire se situe au niveau intra-individuel (hétérozygotie) et inter groupe variétaux (différentiation interspécifique) alors que le polymorphisme intervariétal au sein d'un même groupe est très limité.

Ces résultats mettent en évidence différents facteurs clefs de la structuration de la diversité génétique du germoplasme tunisien : (i) des introductions multiples, (ii) une origine interspécifique des génotypes (groupes variétaux) introduits et (iii) un mode de propagation reposant essentiellement sur la multiplication végétative. Cette connaissance est d'une grande importance pour la mise en place d'évaluation phénotypique efficace, d'une conservation raisonnée et d'une meilleure utilisation de ces ressources génétiques en innovation variétale.

Le germoplasme tunisien présente certains génotypes originaux et les facteurs évolutifs à l'origine de la diversité intraspécifique du germoplasme tunisien ont pu être identifiés grâce aux marqueurs SSRs et SNPs

La multiplication végétative quasi exclusive des porte-greffes d'agrumes, qu'elle résulte de pratiques horticoles (bouturage, marcottage) ou de la propagation par semis des graines polyembryonnées (apomixie facultative), est un élément clef de la structuration et de

l'évolution de la diversité des porte-greffes d'agrumes en Tunisie. Elle fixe en effet des structures génétiques fortement hétérozygotes et maintient une structuration génétique très élevée entre groupes variétaux, en limitant considérablement les flux de gènes. Ainsi, mis à part quelques génotypes, la majorité des accessions tunisiennes se regroupent, au vue des données SSRs et SNPs, conformément avec leurs accessions de références respectives. Hormis le polymorphisme initial issu de multiples introductions, les mécanismes principaux de diversification au sein des vergers tunisiens ont été la sexualité résiduelle des génotypes polyembryonnés, les mutations et les variations épigénétiques.

L'analyse fine des données moléculaires des génotypes se différenciant des références a permis de mettre en évidence trois mécanismes à l'origine du polymorphisme intraspécifique en Tunisie: la mutation, l'autofécondation et l'hybridation interspécifique.

Ces trois types d'évènements ont été identifiés à l'origine du polymorphisme des bigaradiers. Ainsi, deux d'entre eux résulteraient de mutation (bigaradiers de Djerba et de Hammamet), cinq d'autofécondation (de Sbikha et du Cap-Bon) et deux, prospectés à Sbikha, d'hybridation interspécifique (bigaradier x mandarinier et bigaradier x oranger).

Les marqueurs SSRs n'ont pas différencié l'oranger Meski des orangers de référence, indiquant que son phénotype particulier (tolérance élevée au sel) résulte d'un ou plusieurs évènement(s) ponctuel(s) affectant son génome (mutation, mobilité d'élément transposable, variation épigénétique). La mutation ponctuelle (SNP) identifiée chez l'orange Meski (comparativement aux oranges de référence) au niveau du gène *Nrt1a* n'implique pas de variation de la séquence protéique. La grande tolérance de cet oranger à la salinité encourage toutefois à explorer d'avantage l'implication que pourrait avoir cette mutation sur l'expression de ce gène et donc potentiellement sur le phénotype.

Le seul regroupement génétique associé à l'origine géographique des accessions concerne les limes 'Chiiri', 'Arbi' et 'Beldi' originaires des oasis. Depuis longtemps les limes ont été utilisées comme porte-greffes au sud Tunisien particulièrement dans les oasis. Les agriculteurs considèrent que la variété lime 'Chiiri' est la mieux adaptée des porte-greffes d'agrumes aux conditions bioclimatiques locales (salinité et manque d'eau), et signalent qu'elle présente une meilleure capacité d'assimilation d'eau par rapport au bigaradier. Notre étude montre que les limes Tunisiennes 'Arbi' et 'Beldi' sont des variants phénotypiques de la

lime mexicaine. Toutes ces variations relativement importantes entraînent des génotypes rares par rapport aux génotypes communs largement diffusés.

Les études moléculaires (SSRs, SNPs et InDel mitochondriaux) suggèrent que la lime 'Chiiri' résulte d'un croisement entre la lime mexicaine ou l'un de ses mutants (limes 'Arbi' ou 'Beldi') et le cédrat. On y retrouve en effet des loci présentant une hétérozygotie entre allèles de *C. micrantha* et de Cédrat et des loci homozygotes pour des allèles de cédrat. Particulièrement pour les gènes d'intérêt *Nrt1a* et *Sos1*, la lime 'Chiiri' a hérité les 2 allèles du pool de gène *C. medica*. La sensibilité au sel de la lime mexicaine et du cédrat a été montrée (Hussain *et al.*, 2012). Si la lime 'Chiiri' a la capacité à tolérer la salinité comme le suggère l'environnement dans lequel elle est cultivée, on peut penser qu'elle est un hybride de mutants de la lime mexicaine présentant cette capacité d'adaptation comme probablement les limes 'Arbi' ou 'Beldi' cultivés dans les mêmes environnements défavorables.

Enfin, les données SNPS et SSRs suggèrent que la lime douce tunisienne soit un mutant non acide de la 'limonette de Marrakech' et le citronnier de Tozeur soit un mutant des citronniers traditionnels du bassin méditerranéen (type Lisbonne).

La présente étude fait ressortir l'importance de mettre en place des évaluations agronomiques et physiologiques fines des différents génotypes originaux de Tunisie en comparaison avec les variétés de référence. Une priorité devrait être donnée à la réponse aux stress biotique et abiotique et au comportement agronomique sous des conditions environnementales défavorables.

Certains gènes candidats présentent des profils de diversité suggérant une évolution résultant de pression de sélections divergentes

La forte similitude des structurations génétiques révélées par les marqueurs SSRs (notre étude, Ollitrault *et al.*, 2010; Garcia-Lor *et al.* 2012) et les SNPs suggèrent que les facteurs évolutifs qui ont fondé la diversité de chaque classe de marqueurs sont similaires et donc que probablement une majorité des polymorphismes SNPs réponde à une évolution de type neutre. Toutefois, des évidences d'une sélection positive ont été observées pour deux gènes *Nrt1a* et *Sos1* (déterminants très importants de la tolérance à la salinité), aussi bien au niveau de l'échantillon total qu'à l'échelle des taxons de base uniquement. À un moindre degré, une sélection positive est observée pour les gènes *Nrt1a*, *Sos1* ainsi que pour le gène *Ccc* au sein

des espèces *C. maxima* et *C. reticulata*, suggérant une possible variabilité phénotypique pour l'adaptation au sel au sein de chacune de ces espèces. Ce polymorphisme moléculaire non synonyme au sein de *C. reticulata* et *C. maxima* rejoint des observations phénotypiques récemment publiées (Hussain *et al.*, 2012) montrant des variations importantes dans la réponse au stress salin au sein de chacune de ces espèces avec certains génotypes particulièrement tolérants comparativement aux autres taxons ancestraux.

L'analyse au niveau protéique des modifications apportées par les mutations non synonymes aux loci *Nrt1a* et *Sos1* au niveau de tous les génotypes analysés, fait apparaître des structurations très différentes de la diversité, entre les deux gènes. Ces structurations sont directement liées à la phylogénie chez les espèces secondaires, des fragments chromosomiques portant ces gènes et donc à leur structure en mosaïque interspécifique.

La majorité de la diversité allélique non synonyme des gènes que nous avons étudiés, et donc de la diversité protéique correspondante se retrouve entre les taxons de base (pamplemousse – *C. maxima*-, cédrat –*C. medica*-, mandarine –*C. reticulata*- et Papéda –*C. micrantha*-) à partir desquels ont résulté toutes les espèces cultivées du genre *Citrus* (Nicolosi *et al.*, 2000; Ollitrault *et al.*, 2003; Fanciullino *et al.*, 2006). Il est donc probable que la transmission aux espèces secondaires des caractéristiques de tolérance à la salinité portées par certains génotypes de *C. maxima* et de *C. reticulata* soit fortement liée à la structure en mosaïque interspécifique pour les gènes clefs.

Nos observations suggèrent que les gènes *Nrt1a* et *Sos1* pourraient jouer un tel rôle clef dans la différenciation phénotypique pour l'adaptation au stress salin et conduisent à considérer ces gènes comme de bons candidats pour conduire des études de séquençage complet, de génomique fonctionnelle et de génétique d'association.

Propositions pour apporter des solutions concrètes au développement de l'agrumiculture tunisienne et approfondir l'étude de la diversité adaptative du germoplasme tunisien

Notre étude de la diversité du germoplasme a révélé des génotypes originaux au sein du germoplasme tunisien (lime 'Chiiri', lime 'Arbi', orange 'Meski', etc). La sauvegarde par la

conservation *in situ* et *ex situ* de cette variabilité est importante. Une gestion doit être donc considérée à travers les zones de distribution des espèces présentes pour assurer le maintien de cette diversité (Nord, Centre et Sud) et éviter l'impact de l'érosion génétique sur la dynamique de l'évolution de la diversité génétique de ces espèces. Par ailleurs, sur le plan cognitif, il serait utile d'étendre les études de diversité à plusieurs autres accessions de lime afin de fournir d'avantage d'éléments qui nous permettront de mieux comprendre l'origine des lime tunisiennes, qui ont fait leurs preuves au sud du pays (oasis, Degache, Tozeur), ainsi que leur phylogénie évolutive en matière de tolérance au sel.

Notre analyse de la conformité génétique des porte-greffes d'agrumes en collections et parcs semenciers a dévoilé une hétérogénéité au sein de certaines accessions et la non conformité pour les citranges (Carrizo et Troyer), le mandarinier Cléopâtre, le *C. volkameriana* et le *C. macropylla* par rapport aux génotypes de référence qui peuvent s'expliquer par (i) des problèmes de traçabilité lors de l'introduction des accessions ou l'installation des parcelles de collection, (ii) la mort du greffon et la reprise du porte greffe pour certains arbres de collection, (iii) la présence de plants d'origine zygotique résultant d'une introduction par graines. La conformité du matériel végétal est un élément clef de l'agrumiculture moderne. Elle doit s'adosser sur des parcs semenciers et des parcs à bois, fournissant le matériel végétal distribué aux pépiniéristes et aux agriculteurs, dont l'origine génétique du matériel est certifiée. Un rapport contenant les résultats des analyses des parcs semenciers et les recommandations nécessaires a été distribué aux responsables des stations pour concrétiser cette contribution à la gestion des pieds mères des schémas de propagation tunisiens. A court terme, le contrôle systématique de la conformité génétique des collections de porte-greffes, pourrait offrir une garantie sur les arbres-mères des schémas de multiplication des porte-greffes et donc assurer une meilleure conformité du matériel planté et l'homogénéité du comportement agronomique en verger.

La variabilité génétique identifiée grâce à cette thèse pourrait être exploitée soit directement par les pépiniéristes et les cultivateurs, soit par les améliorateurs afin de combiner résistance aux stress biotique et abiotique, et améliorer le comportement horticole par les méthodes d'amélioration conventionnelle ou les approches biotechnologiques, comme l'hybridation somatique et ses applications (Grosser *et al.*, 2000; Ollitrault *et al.*, 2000a; Navarro *et al.*, 2004; Guo et Grosser, 2005; Pio *et al.*, 2006; Bassene *et al.*, 2010; Grosser et Gmitter, 2010; Dambier *et al.*, 2011), et la transformation génétique (Fagoaga *et al.*, 2006; Omar *et al.*, 2007;

Barbosa-Mendes *et al.*, 2009; Cervera *et al.*, 2010; de Campos *et al.*, 2011; Orbovic *et al.*, 2011).

Le nombre significatif de loci SNPs découverts pourrait être converti en marqueurs efficaces dans le cadre du développement d'outils de génotypage à haut débit qui seraient très utiles aussi bien pour la gestion des collections d'agrumes que pour les études d'association marqueur/trait. Pour ces dernières, le génotypage devrait être accompagné d'études physiologiques fines du germoplasme tunisien.

Le séquençage complet (incluant le séquençage de la séquence promotrice) des gènes pour lesquels ont été identifiées des sélections positives, appuyé d'une analyse fonctionnelle approfondie des différents allèles pourrait fournir des pistes de réflexion intéressantes sur la base moléculaire de la différenciation phénotypique relative au caractère de tolérance à la salinité et considérablement améliorer nos connaissances et notre compréhension des rôles que ces gènes jouent sur la tolérance au stress salin chez les espèces du genre *Citrus*. Ces travaux pourront s'appuyer sur les séquences complètes des génomes complets de la clémentine haploïde et de l'orange douce (aujourd'hui librement disponibles sur internet : phytozome.org), Cela pourrait conduire à l'identification de marqueurs pour le repérage de cultivars intéressants ainsi que la sélection assistée par marqueurs (MAS).

Références bibliographiques

- Abaab A. et Elloumi M. 2001. L'évolution des structures des exploitations agricoles et mutations de l'agriculture tunisienne. In Jouve A.M. (ed.). *Terres méditerranéennes: le morcellement, richesse ou danger?* Chapitre 6, pp. 103-126.
- Abdedayem S. et Boukchina R. 2008. Programme régional d'économie d'eau d'irrigation dans le gouvernorat de Gabès : essai d'évaluation. *New Medit*, vol. 7, n. 2 p 31-35.
- Abkenar A.A., Isshiki S., Tashiro Y. 2004. Phylogenetic relationships in the "true citrus fruit trees" revealed by PCR-RFLP analysis of cpDNA. *Scientia Horticulturae*. 102: 233–242.
- Adams K.L., Cronn R., Percifield R., Wendel J.F. 2003. Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organspecific reciprocal silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100: 4649–4654.
- Ahmad R., Struss D., Southwick S.M. 2003. Development and characterization of microsatellite markers in Citrus. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 128: 584–590.
- Aishwarya V., Grover A. and Sharma P.C. 2007. EuMicroSatdb: A database for microsatellites in the sequenced genomes of eukaryotes. *BMC Genomics*. 8:225, pp. 1-8. doi:10.1186/1471-2164-8-225.
- Ajay A., Divya C. *et al.* 2008. Compositional variation in beta carotene content, carbohydrate and antioxidant enzymes in selected banana cultivars. *International Journal of Food Science & Technology*. 43: 1913-1921.
- Albrigo L.G. (ed.). 2001. *Proceedings of the Global Citrus Germplasm Network. Network meeting held during the Ninth Congress of the International Society of Citriculture, International Society of Citriculture, Orlando, Florida.*
- Albrigo L.G., Gmitter F.G. and Menini U.G. 1997. Requirements and priorities for citrus germplasm conservation. In: Albrigo L.G. (ed.) *Identification and Conservation of Genetic Resources of Citrus and Its Relatives. Proceedings of a Symposium held during the VIII Congress of the International Society of Citriculture, Sun City, South Africa*, pp. 6–10.
- Aleza P., Juárez J., Cuenca J., Ollitrault P., Navarro L. 2010a. Recovery of citrus triploid hybrids by embryo rescue and flow cytometry from 2x X 2x sexual hybridisation and its application to extensive breeding programs. *Plant Cell Reports*. 29(9): 1023-34. <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-010-0888-7>.
- Aleza P., Juárez J., Ollitrault P., Navarro L. 2010b. Polyembryony in non-apomictic Citrus genotypes. *Annals of Botany*. 106(4): 533-45. <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcq148>.
- Aleza P., Froelicher Y., Schwarz S., Agustí M., Hernández M., Juárez J., Luro F., Morillon R., Navarro L., Ollitrault P. 2011. Tetraploidization events by chromosome doubling of nucellar cells are frequent in apomictic citrus and are dependent on genotype and environment. *Annals of Botany*. 108(1): 37-50. <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcr099>.
- Aleza P., Juárez J., Cuenca J., Ollitrault P., Navarro L. 2012a. Extensive citrus triploid hybrid production by 2x x 4x sexual hybridizations and parent-effect on the length of the juvenile phase. *Plant Cell Reports*. 31(9): 1723-1735. <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-012-1286-0>.
- Aleza P., Juárez J., Hernández M., Ollitrault P. et Navarro L. 2012b. Implementation of extensive citrus triploid breeding programs based on 4x x 2x sexual hybridisations. *Tree genetics & genomes*. doi: 10.1007/s11295-012-0515-6.
- Alghanim H.J. et Almirall J.R. 2003. Development of microsatellite markers in Cannabis sativa for DNA typing and genetic relatedness analyses. *Anal. Bioanal. Chem*. 376(8):1225-33.
- Al-Jaleel A., Zekri M., Hammam Y. 2005. Yield, fruit quality, and tree health of 'Allen Eureka' lemon on seven rootstocks in Saudi Arabia. *Scientia Horticulturae*. 105: 457–465.
- Allario T. 2009. Identification de déterminants physiologiques et moléculaires de la tolérance à la contrainte saline et au déficit hydrique de porte-greffes autotétraploïdes d'agrumes. Thèse de doctorat. Université De Corse – Pascal Paoli. 291p.

- Almansa M.S., Hernandez J.A. *et al.* 2002. Effect of salt stress on the superoxidase dismutase activity in leaves of *Citrus limonum* in different rootstock-scion combinations. *Biologia Plant.* 45: 545-549.
- Al-Yassin A. 2004. Influence of salinity on *Citrus*: a review paper. *Journal of Central European Agriculture.* 5: 263–272.
- Amar M.H., Biswas M.K., Zhang Z., Guo W. 2011. Exploitation of SSR, SRAP and CAPS-SNP markers for genetic diversity of *Citrus* germplasm collection. *Scientia Horticulturae.* 128: 220 – 227.
- Amtmann A. et Sanders D. 1999. Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. *Adv. Bot. Res.* 29: 75–112.
- Ananthakrishnan G., Orbovic V., Pasquali G. *et al.* 2007. Transfer of Citrus Tristeza Virus (CTV)-derived resistance candidate sequences to four grapefruit cultivars through *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant.* 43(6): 593-601.
- Andrade-Rodríguez M., Villegas-Monter A. *et al.* 2004. Polyembryony and identification of Volkamerian lemon zygotic and nucellar seedlings using RAPD. *Pesq. agropec. bras., Brasília.* 39(6): 551-559.
- Anjum M.A. 2008. Effect of NaCl concentrations in irrigation water on growth and polyamine metabolism in two citrus rootstocks with different levels of salinity tolerance. *Acta Physiol. Plant.* 30: 43-52.
- Anjum M.A., Abid M., Naveed F. 2001. Evaluation of Citrus rootstocks for Salinity Tolerance at Seedling Stage. *International Journal of Agriculture & Biology.* pp. 1560–8530.
- Antcliff A.J., Newman H.P. et Barrett H.C. 1983. Variation in chloride accumulation in some American species of grapevine. *Vitis.* 22: 357-362.
- Apse M.P., Sottosanto J., Blumwald E. 2003. Vacuolar cation/H⁺ exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of AtNHX1, the *Arabidopsis* vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter. *The Plant Journal.* 36: 229-239.
- Apse M.P., Aharon G.S., Snedden W.A., Blumwald E. 1999. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science.* 285: 1256–58.
- Arbona V., Flors V., Jacas J. *et al.* 2003. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses of Carrizo citrange, a salt-sensitive citrus rootstock, to different levels of salinity. *Plant Cell Physiol.* 44: 388–394.
- Arbona V., Marco A.J., Iglesias D.J. *et al.* 2005. Carbohydrate depletion in roots and leaves of salt-stressed potted *Citrus clementina* L. *Plant Growth Regul.* 46: 153–160.
- Arnaud-Haond S., Duarte C.M. *et al.* 2007. Standardizing methods to address clonality in population studies. *Mol. Ecol.* 16: 5115-5139. Doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03535.x. PMID:17944846.
- Ashraf M. 1994. Breeding for salinity tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13: 17-42.
- Asins M.J., Mestre P.F., Herrero R., Navarro L. et Carbonell E. 1997. Molecular markers: a continuously growing biotechnology area to help citrus improvement. *Proc. of the 5th ISCN International Congress. Fruits* 53(5): 293-302.
- Asins M.J., Garcia M.R., Ruiz C. and Carbonell E.A. 2002. Molecular markers for the genetic analysis of apomixis. In: Jain S.M., Brar D.S. and Ahloowalia B.S. (eds.). *Molecular Techniques in Crop Improvement.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 265-281.
- Asker S.E. and Jerling L. 1992. *Apomixis in plants.* CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Auger D.L., Gray A.D., Ream T.S. *et al.* 2005. Non additive gene expression in diploid and triploid hybrids of maize. *Genetics.* 169: 389–397.

- Ayeh K.O. 2008. Expressed sequence tags (ESTs) and single nucleotide polymorphisms (SNPs): Emerging molecular marker tools for improving agronomic traits in plant biotechnology. *African Journal of Biotechnology*. 7(4): 331-341.
- Babu R.C., Zhang J. *et al.* 2004. *HVA1*, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. *Plant Sci.* 166: 855-862.
- Bagci S.A., Ekiz H., Yilmaz A. 2007. Salt tolerance of sixteen wheat genotypes during seedling growth. *Turk. J. Agric. For.* 31: 363–372.
- Bañuls J. & Primo-Millo E. 1995. Effects of salinity on some citrus scion–rootstock combinations. *Annals of Botany*. 76: 97–102.
- Bar Y., Apelbaum A. *et al.* 1997. Relationships between chloride and nitrate and its effect on growth and mineral composition of avocado and citrus plants. *J. Plant Nutr.* 20: 715-731.
- Barbosa-Mendes J.M., Mourão Filho F.A.A. *et al.* 2009. Genetic transformation of *Citrus sinensis* cv. Hamlin with *hrpN* gene from *Erwinia amylovora* and evaluation of the transgenic lines for resistance to citrus canker. *Scientia Horticulturae*. 122: 109–115.
- Barkley N.A., Roose M.L., Krueger R.R. and Federici C.T. 2006. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theoretical and Applied Genetics*. 112: 1519 –1531.
- Barkley N.A., Krueger R.R., Federici C.T., Roose M.L. 2009. What phylogeny and gene genealogy analyses reveal about homoplasy in Citrus microsatellite alleles. *Plant Systematics and Evolution*. 282: 71–86.
- Barr C. M., Neiman M. et Taylor D.R. 2005. Inheritance and recombination of mitochondrial genomes in plants, fungi and animals. *New Phytol.* 168: 39–50.
- Barrett H.C. 1977. Intergeneric hybridization of citrus and other genera in citrus cultivar improvement. *Proceedings of the Second International Citrus Congress: Orlando, Florida. International Society of Citriculture (ISC) 1977*, 2:586-589.
- Barrett H.C. 1982. Breeding cold hardy citrus scion varieties. *Proc. Int. Soc. Citric. Cong.* 1:61-68.
- Barrett H.C. and Rhodes A.M. 1976. A numerical taxonomic study of the affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. *Systematic Botany*. 1: 105–136.
- Barton N.H. et Keightley P.D. 2002. Understanding quantitative genetic variation. *Nature Reviews Genetics*. 3: 11-20.
- Bassal M.A. 2009. Growth, yield and fruit quality of ‘Marisol’ clementine grown on four rootstocks in Egypt. *Scientia Horticulturae*. 119: 132-137.
- Bassene J.B., Froelicher Y., Dubois C., Ferrer R.M., Navarro L., Ollitrault P., Ancillo G. 2010. Non-additive gene regulation in a citrus allotetraploid somatic hybrid between *C. reticulata* Blanco and *C. limon* (L.) Burm. *Heredity*. 105: 299–308.
- Bassil E., Tajima H. *et al.* 2011. The *Arabidopsis* Na⁺/H⁺ antiporters NHX1 and NHX2 control vacuolar pH and K⁺ homeostasis to regulate growth, flower development, and reproduction. *The Plant Cell*. 23: 3482–3497.
- Batley j. et Edwards d. 2007. SNP applications in plants. In: Oraguzie, N.C. *et al.* (eds.). *Association mapping in plants*. New York, Springer, 2007, pp. 95-102.
- Battaglia M., Olvera-Carrillo Y., Garcíarrubio A. *et al.* 2008. The Enigmatic LEA Proteins and Other Hydrophilins. Update on LEA Proteins and Other Hydrophilins. *Plant Physiology*. 148: 6–24.
- Batygina T.B. and Vinogradova G.Y. 2007. Phenomenon of polyembryony. Genetic heterogeneity of seeds. *Russian Journal of Developmental Biology*. 38: 126-151.

- Bausher M., Shatters R. *et al.* 2003. An expressed sequence tag (EST) set from *Citrus sinensis* L. Osbeck whole seedlings and the implications of further perennial source investigations. *Plant Science*. 165: 415-422.
- Bayer R.J., Mabberley D.J., Morton C. *et al.* 2009. A molecular phylogeny of the orange subfamily (Rutaceae: Aurantioideae) using nine cpDNA sequences. *American Journal of Botany*. 96: 668 – 685.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F. 1996-2004. GENETIX 4.05, logiciel sous WindowsTM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II ; Montpellier; France.
- Ben Mechlia N. 2009. Détermination des priorités d'intervention dans le secteur des agrumes: Résumés des communications. CTA, 2009, pp.2.
- Berdaguer D. 2009. Élaboration d'un modèle biodécisionnel relatif à l'irrigation des *Citrus* en contexte Méditerranéen: caractérisation et modélisation des règles de décision des agrumiculteurs dans le Cap-Bon (Tunisie). Master, Université de Bordeaux 1. 34p.
- Bernet G.P., Mestre P.F. *et al.* 2004. Molecular discrimination of lemon cultivars. *HortScience*. 39(1): 165-169.
- Bernet G.P., Fernandez-Ribacoba J., Raga V., Asins M.J. 2008. Comparison of linkage maps among six citrus species: structural differences and genetic inferences. In: Deng X. Xu J, Lin S, Guan R (eds.) *Proceeding 11th International Citrus Congress*, vol.1 China Agriculture Press, Beijing, pp. 463.
- Bernet G.P., Fernandez-Ribacoba J., Carbonell E.A., Asins M.J. 2010. Comparative genome-wide segregation analysis and map construction using a reciprocal cross design to facilitate citrus germplasm utilization. *Mol Breeding*. 25: 659–673.
- Berrin J.G., Pierrugues O. *et al.* 2005. Stress induces the expression of AtNADK-1, a gene encoding a NAD(H) kinase in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics*. 273: 10 – 19.
- Berthomieu P., Conejero G. *et al.* 2003. Functional analysis of AtHKT1 in *Arabidopsis* shows that Na(+) recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *EMBO J*. 22: 2004–2014.
- Bettencourt E., Hazekamp T. and Perry M.C. 1992. *Directory of Germplasm Collections*. 6.1. Tropical and Subtropical Fruits and Tree Nuts. International Board for Plant Genetic Resources, Rome.
- Bhatramakki D., Dolan M. *et al.* 2002. Insertion-deletion polymorphisms in 3' regions of maize genes occur frequently and can be used as highly informative genetic markers. *Plant Mol. Biol*. 48: 539-547.
- Bindler G., Plieske J. *et al.* 2011. A high density genetic map of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) obtained from large scale microsatellite marker development. *Theor. Appl. Genet*. 123:219–230. DOI 10.1007/s00122-011-1578-8.
- Biswas M.K., Baig M. N. R. *et al.* 2010. Retro-transposon based genetic similarity within the genus *Citrus* and its relatives. *Genet. Resour. Crop Evol*. 57: 963–972. DOI 10.1007/s10722-010-9533-0
- Blom-Zandstra M., Vogelzang S.A., Veen B.W. 1998. Sodium fluxes in sweet pepper exposed to varying sodium concentrations. *Journal of Experimental Botany*. 49: 1863-1868.
- Blumwald E., Aharon G.S., Apse M.P. 2000. Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1465: 140-151.
- Bohnert H.J. et Jensen R.G. 1996. Strategies for engineering water stress tolerance in plants. *Trends in Biotechnol*. 14: 89-97.
- Bond J. E. & Roose M. L. 1998. *Agrobacterium*-Mediated Transformation of the Commercially Important Citrus Cultivar Washington Navel Orange. *Plant Cell Reports*. 18(3-4): 229-234.
- Bonilla P., Dvorak J., Mackill D. *et al.* 2002. RFLP and SSLP mapping of salinity tolerance genes in chromosome 1 of rice (*Oryza sativa* L.) using recombinant inbred lines. *Philipp. Agric. Sci*. 85: 68–76.
- Bono R., Fernandez de Cordova L. and Soler J. 1982. Arrufatina, Esbal and Guillermina, three Clementine mandarin mutation recently appearing in Spain. *Proc. Int. Soc. Citric*. 1: 94-96.

Boo K.H., Kim D.W. *et al.* 2007. Construction and Profiling of a cDNA Library from Young Fruit of Satsuma Mandarin. *Journal of Plant Biology*. 50(4): 403-409.

Bordás M., Montesinos C., Dabauza M. *et al.* 1997. Transfer of the yeast salt tolerance gene *HAL1* to *Cucumis melo* L. cultivars and *in vitro* evaluation of salt tolerance. *Transgenic Res.* 5:1–10.

Boughanmi H. 1995. Les principaux volets des politiques agricoles en Tunisie: évolution, analyse et performances agricoles. Options méditerranéennes, Sér. B/n°14. les agricultures maghrébines à l'aube de l'an 2000, pp. 127-138.

Bouillé M. et Bousquet J. 2005. Trans-species shared polymorphisms at orthologous nuclear gene loci among distant species in the conifer *Picea* (Pinaceae): implications for the long-term maintenance of genetic diversity in trees. *Am. J. Bot.* 92(1): 63-73.

Boulaâba I. 2009. Peut-on atteindre la capacité d'exploitation escomptée des agrumes? Actualités du webmanagercenter. Article 80697. <http://www.webmanagercenter.com>.

Bouteyre G. 1992. Une calamité pour l'agriculture en zone aride: la salinisation des terres irriguées en basse vallée de l'Euphrate (République arabe syrienne). L'aridité, une contrainte au développement, caractérisation, réponses biologiques, stratégies des sociétés. Ed. Orstom, Paris, pp. 401-417.

Bretó M.P., Ruiz C., Pina J.A., Asins M.J. 2001. The Diversification of *Citrus clementina* Hort. ex Tan., a Vegetatively Propagated Crop Species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 21(2): 285–293.

Brini F., Hanin M. *et al.* 2007. Overexpression of wheat Na^+/H^+ antiporter *TNHX1* and H^+ -pyrophosphatase *TVP1* improve salt- and drought-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* plants. *J. Exp. Bot.* 58: 301–8.

Brlansky R.H., Lee R.F. and Garnsey S.M. 1988. *In situ* immunofluorescence for the detection of citrus tristeza virus inclusion bodies. *Plant disease*. 72: 1039-1041.

Broadbent P., Sykes S.R., Bevington K.B. and Hailstones D. (eds.). 1999. Proceedings of the Citrus Germplasm Conservation Workshop. Brisbane, Australia, October 1997.

Brookes A.J. 1999. The essence of SNPs. *Gene*. 234: 177–186.

Brown G.R., Gill G.P., Kuntz R.J. *et al.* 2004. Nucleotide diversity and linkage disequilibrium in loblolly pine. *PNAS*. 101(42): 15255-15260.

Brumós J., Talón M., Bouhlal R. & Colmenero-Flores J.M. 2010. Cl^- homeostasis in includer and excluder citrus rootstocks: transport mechanisms and identification of candidate genes. *Plant, Cell and Environment*. 33: 2012–2027.

Brumós J., Colmenero-Flores J., Conesa A. *et al.* 2009. Membrane transporters and carbon metabolism implicated in chloride homeostasis differentiate salt stress responses in tolerant and sensitive Citrus rootstocks. *Functional & Integrative Genomics*. 9: 293–309.

Burle M.L., Fonseca J.R. *et al.* 2010. Microsatellite diversity and genetic structure among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in Brazil, a secondary center of diversity. *Theor. Appl. Genet.* 121:801–813. DOI 10.1007/s00122-010-1350-5.

Cai Q., Guy C.L., Moore G.A. 1994. Extension of the linkage map in *Citrus* using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation-responsive loci. *Theor. Appl. Genet.* 89: 604-614.

Calabrese F. 1998. La Favolosa Storia degli Agrumi, l'EPOS, Palermo, Italy.

Calabrese F. 2002. Origin and history. In: Dugo G. et Di Giacomo A. (eds.). *Citrus. The Genus Citrus*. Taylor and Francis Group, London, pp. 1-15.

- Cámara Zapata J. M., Nieves M., Cerdá A. 2003. Improvement of growth and salt resistance of lemon (*Citrus limon*) trees by an interstock-induced mechanism. *Tree Physiology*. 23:879-888.
- Cámara Zapata J.M., Garcia-Sanchez F. *et al.* 2004. Effect of NaCl on citrus cultivars. *Agronomie*. 24: 155-160.
- Cameron J.W. et Frost H.B. 1968. Genetic, breeding and nucellar embryony. In: Reuther W, Webber HJ. and Batchelor LD. (eds), *The Citrus Industry*, vol I. University of California, Riverside, pp. 325-370.
- Campos E.T. *et al.* 2005. Characterization of mandarin (*Citrus* spp.) using morphological and AFLP markers. *Interciencia*. 30(11): 687-693.
- Capparelli R., Viscardi M. *et al.* 2004. Inter-simple sequence repeat markers and flow cytometry for the characterization of closely related *Citrus limon* germplasms. *Biotechnology Letters*. 26: 1295–1299.
- Carden D.E., Walker D.J., Flowers T.J., Miller A.J. 2003. Single-cell measurements of the contributions of cytosolic Na⁺ and K⁺ to salt tolerance. *Plant Physiol*. 131: 676–83.
- Cervera M., Navarro L., Peña L. 2009. Gene stacking in 1-year-cycling APETALA1 citrus plants for a rapid evaluation of transgenic traits in reproductive tissues. *J. Biotech*. 140: 278–282.
- Cervera M., Ortega C., Navarro L., Navarro A., and Peña L. 2000. Generation of transgenic citrus plants with the tolerance-to-salinity gene HAL2 from yeast. *J Hort. Sci. Biotech*. 75: 26–30.
- Cervera M., Esteban O., Gil M. *et al.* 2010. Transgenic expression in *Citrus* of Single-Chain Antibody fragments specific to Citrus Tristeza Virus confers virus resistance. *Transgenic Research*. 19(6): 1001-1015.
- Chagné D. *et al.* 2012. Genome-Wide SNP Detection, Validation, and Development of an 8K SNP Array for Apple. *PLoS ONE*. 7(2): e31745. doi:10.1371/journal.pone.0031745.
- Chai M.F., Chen Q.J., An R. *et al.* 2005. NADK2, an *Arabidopsis* chloroplastic NAD kinase, plays a vital role in both chlorophyll synthesis and chloroplast protection. *Plant Molecular Biology*. 59: 553 – 564.
- Chai M.F., Wei P.C., Chen Q.J. *et al.* 2006. NADK3, a novel cytoplasmic source of NADPH, is required under conditions of oxidative stress and modulates abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 47: 665 – 674.
- Chaves M.M., Flexas J., Pinheiro C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann. Bot*. 103: 551-560.
- Chen Z.S. 1992. Identification of salt-tolerance of citrus germplasm. *Acta Hort. Sinica* 19: 289-295.
- Chen Z.J. 2007. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annu. Rev. Plant Biol*. 58:377–406.
- Chen T.H.H. et Murata N. 2002. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current Opinion in Plant Biology*. 5: 250–257.
- Chen C., Zhou P. *et al.* 2006. Mining and characterizing microsatellites from citrus ESTs. *Theor. Appl. Genet*. 112:1248–1257.
- Chen H., An R. *et al.* 2007a. Over-expression of a vacuolar Na⁺ /H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in an upland rice. *Mol. Breed*. 19: 215–25.
- Chen Z., Zhou M., Newman I.A. *et al.* 2007b. Potassium and sodium relations in salinised barley tissues as a basis of differential salt tolerance. *Funct. Plant Biol*. 34:150–162.
- Chen C., Bowman K.D. *et al.* 2008. EST-SSR genetic maps for *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. *Tree Genetics & Genomes*. 4:1–10. DOI 10.1007/s11295-007-0083-3.

- Cheng Y.J., Guo W.W., Deng X.X. 2003. Molecular characterization of cytoplasmic and nuclear genomes in phenotypically abnormal Valencia orange (*Citrus sinensis*) + Meiwa kumquat (*Fortunella crassifolia*) intergeneric somatic hybrids. *Plant Cell Rep.* 21: 445–451.
- Cheng F. *et al.* 1995. Origin and inheritance of dwarfing by the citrus rootstock *Poncirus trifoliata* 'Flying dragon'. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 120: 286-291.
- Ching A., Caldwell K.S. *et al.* 2002. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. *BMC Genet.* 3:19.
- Chinnusamy V. et Zhu J.K. 2004. Plant salt tolerance. In: *Plant Responses to Abiotic Stress. Topics in Current Genetics*, vol. 4. H. Hirt, K. Shinozaki (eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 241-270.
- Chinnusamy V., Schumaker K., Zhu J.K. 2004. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J. Exp. Bot.* 55: 225–236.
- Chinnusamy V., Jagendorf A., Zhu J. K. 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*, 45: 437-448.
- Chinnusamy V., Zhu J.H. and Zhu J.K. 2006. Salt stress signaling and mechanisms of plant salt tolerance. In: *Genetic Engineering principles and methods*. Vol. 27. Jane K. Setlow (ed.), Springer Science + Business Media, Inc New York. USA. pp. 141-177.
- Cho R.J., Mindrinos M. *et al.* 1999. Genome-wide mapping with biallelic markers in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.* 23: 203-207.
- Cipriani G., Marrazzo M.T. *et al.* 2002. Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europae* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 104: 223-228.
- Close T.J., Wanamaker S., Lyon M. *et al.* 2006. A GeneChip® for citrus. In: *Plant & Animal Genome XIV Conference*; January 2006; San Diego, Calif, USA. pp. 82.
- Colmenero-Flores J.M., Martinez G. *et al.* 2007. Identification and functional characterization of cation–chloride cotransporters in plants. *The Plant Journal*. 50: 278–292.
- Colmer T.D., Munns R., Flowers T.J. 2005. Improving salt tolerance of wheat and barley: future prospects. *Aust. J. Exp. Agric.* 45:1425–43.
- Corazza-Nunes M.J., Machado M.A. *et al.* 2002. Assessment of genetic variability in grapefruits (*Citrus paradisi* Macf.) and pummelos (*C.maxima* (Burm.) Merr.) using RAPD and SSR markers. *Euphytica*. 126: 169–176.
- Cortés A.J., Chavarro M.C. et Blair M.W. 2011. SNP marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor. Appl. Genet.* 123:827–845.
- Cortina C. et Culiáñez-Maciá F.A. 2005. Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Sci.* 169: 75–82.
- Cottin R. 1999. EGID, a computerised database system for *Citrus*. In : Broadbent P., Sykes S.R., Bevington K.B. (eds.), *Proceedings Citrus germplasm conservation workshop*, Brisbane, October 1997. Orange : NSW Agriculture, pp.43.
- Cottin R., Allent V., Jacquemond C. 1995. Gestion informatique des ressources génétiques: Egid. In: *Symposium méditerranéen sur les mandarines*. San Giuliano, France, Inra, pp. 2.
- Cramer G.R. et Bowman D.C. 1991. Kinetics of maize leaf elongation. I. Increased yield threshold limits short-term, steady-state elongation rates after exposure to salinity. *J. Exp. Bot.* 42:1417–26.

- Crane C.F. 2001. Classification of apomictic mechanisms. In: Savidan Y., Carman J.G. and T. Dresselhaus (eds.). The flowering of Apomixis: from mechanisms to genetic engineering. Mexico, DF: CIMMYT, IRD, European Commission DG VI (FAIR), pp. 24-43.
- CRDA. 2008. Étude de la gestion intégrée des ressources hydrauliques du Cap Bon. Volume 1. Rapport général. CRDA, 2008. 56 p.
- Crespan M. 2004. Evidence of the evolution of polymorphism of microsatellite markers in varieties of *Vitis vinifera* L. Theor. Appl. Genet. 108: 231-237.
- Cristofani M. et Machado M.A. 2000. Molecular markers linked to Citrus Tristeza Virus (CTV) resistance gene in cultivars and hybrids of *Poncirus trifoliata*. ISHS Acta Horticulturae 535: First International Citrus Biotechnology Symposium.
- Cristofani M., Machado M.A. & Grattapaglia D. 1999. Genetic linkage maps of *Citrus sunki* Hort.ex. Tan. And *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. and mapping of citrus tristeza virus resistance gene. Euphytica. 109: 25–32.
- Cuenca J., Aleza P., Juárez J., Pina J.A. Navarro L. 2010. 'Safor' mandarin: a new citrus mid-late triploid hybrid. HortScience. 45(6): 977-980.
- Cuenca J., Froelicher Y., Aleza P., Juárez J., Navarro L. and Ollitrault P. 2011. Multilocus half-tetrad analysis and centromere mapping in citrus: evidence of SDR mechanism for 2n megagametophyte production and partial chiasma interference in mandarin cv 'Fortune. Heredity. 107: 462–470.
- Cuin T.A., Betts S.A., Chalmandrier R. et al. 2008. A root's ability to retain K⁺ correlates with salt tolerance in wheat. J. Exp. Bot. 59: 2697–2706.
- Dai X., Xu Y., Ma Q. et al. 2007. Overexpression of an R1R2R3 MYB gene, *OsMYB3R-2*, increases tolerance to freezing, drought, and salt stress in transgenic *Arabidopsis*. Plant Physiology. 143: 1739–1751.
- Dambier D., Benyahia H. et al. 2011. Somatic hybridization for citrus rootstock breeding: an effective tool to solve some important issues of the Mediterranean citrus industry. Plant Cell Rep. 30: 883–900.
- Davenport R.J., Muñoz-Mayor A. et al. 2007. The Na⁺ transporter AtHKT1 controls xylem retrieval of Na⁺ in *Arabidopsis*. Plant Cell Environ. 30: 497–507.
- Davies F.S. and Albrigo L.G. 1994. Citrus. Wallingford, UK : CAB International, 254p.
- Davies W. J., Kudoyarova G., Hartung W. 2005. Long-distance ABA signaling and its relation to other signaling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plants response to drought. J. Plant Growth Regul. 24: 285-295.
- de Araújo E.F., de Queiroz L.P., Machado M.A. 2003. What is Citrus? Taxonomic implications from a study of cp-DNA evolution in the tribe Citreae (Rutaceae subfamily Aurantioideae). Org. Divers. Evol. 3: 55–62.
- de Campos M.K.F., de Carvalho K. et al. 2011. Drought tolerance and antioxidant enzymatic activity in transgenic 'Swingle' citrumelo plants over-accumulating proline. Environ Exp Bot. doi:10.1016/j.envexpbot.2011.03.009
- de Moraes A.P., Soares Filho W.D.S., Marcelo G. 2007. Karyotype diversity and the origin of grapefruit. Chromosome Research. 1: 115-121.
- Deng X.X., Yi H.L., Li F. and Guo W. 1996. Triploid plants regenerated from crossing diploid pummelo and tangerine with allotetraploid somatic hybrid of citrus. In: Proceedings of the Eighth International Citrus Congress. International Society of Citriculture, Sun City, South Africa, Vol. 1, pp.189–192.
- de Oliveira A.C., Garcia A.N., Cristofani M. & Machado M.A. 2002. Identification of citrus hybrids through the combination of leaf apex morphology and SSR markers. Euphytica. 128: 397–403.
- de Oliveira R.P., Cristofani M. and Machado M.A. 2005. Integrated genetic map of citrus based on RAPD markers. Fruits. 60: 187-193. DOI:10.1051/fruits:2005025

- De Pasquale F., Siragusa M. *et al.* 2006. Characterization of five sour orange clones through molecular markers and leaf essential oils analysis. *Scientia Horticulturae*. 109: 54–59.
- Dereeper A., Guignon V., Blanc G. *et al.* 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research*. 36: W465–W469. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn180>.
- De Simone M., Russo M.P. *et al.* 1998. Construction genetic linkage maps for *Citrus aurantium* and *C. latipes* based on RFLP, RAPD and RFLP markers. *Fruits* 53: 383–390.
- de Vienne D. (ed.). 1998. Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. INRA. Editions Quae, 200p.
- Ding S.Q., Zhang X.N., Bao Z.R. and Ling M.Q. 1984. A new species of *Poncirus* from China. *Acta Botanica Yunnanica*. 6: 292–293.
- Ding M., Hou P., Shen X. *et al.* 2010. Salt-induced expression of genes related to Na^+/K^+ and ROS homeostasis in leaves of salt-resistant and salt-sensitive poplar species. *Plant Mol. Biol.* 73: 251–269.
- Domínguez A., Hermoso de Mendoza A. *et al.* 2002. Pathogen-derived resistance to citrus tristeza virus (CTV) in transgenic Mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing.) plants expressing its p25 coat protein gene. *Molecular Breeding*. 10: 1–10.
- Dong J., Qing-liang Y., Fu-sheng W., Li C. 2010. The mining of Citrus EST-SNP and its application in cultivar discrimination. *Agricultural Sciences in China*. 9: 179 – 190.
- Dugo G. *et al.* Di Giacomo A. 2002. Citrus. The Genus Citrus. Medicinal and aromatic Plants-industrial profiles. Taylor and Francis Group, London, 642 p.
- Duminil J., Pemonge M.H., Petit R.J. 2002. A set of 35 consensus primer pairs amplifying genes and introns of plant mitochondrial DNA. *Mol. Ecol. Notes*. 2: 428–430.
- Dure L., Greenway S.C., Galau G.A. 1981. Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by *in vitro* and *in vivo* protein synthesis. *Biochemistry*. 20: 4162–4168.
- Durham R.E., Liou P.C., Gmitter Jr. F.G. and Moore G.A. 1992. Linkage of restriction fragment length polymorphisms and isozymes in Citrus. *Theor. Appl. Genet.* 84: 39–48.
- Dutt M. *et al.* Grosser J.W. 2010. An embryogenic suspension cell culture system for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus*. *Plant Cell Rep.* 29(11): 1251–60.
- Dutt M., Madhavaraj J., Grosser J.W. 2010. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation and plant regeneration from a complex tetraploid hybrid citrus rootstock. *Scientia Horticulturae*. 123: 454–458.
- Eckert A.J., Wegrzyn J.L. *et al.* 2009. Multilocus Patterns of Nucleotide Diversity and Divergence Reveal Positive Selection at Candidate Genes Related to Cold Hardiness in Coastal Douglas Fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*). *Genetics*. 183(1): 289–298.
- Edwards J., Shavrukov Y., Ramsey C. *et al.* 2008. Identification of a QTL on chromosome 7AS for sodium exclusion. In: Appels R., Eastwood R., Lagudah E., Langridge P., Mackay M., McIntyre L., Sharp P. (eds.). Proceedings of 11th international wheat genetics symposium. Sydney University Press, Australia.
- Elisiario P.J., Justo E.M. and Leitão J.M. 1999a. Identification of mandarin hybrids by isozyme and RAPD analysis. *Scientia Horticulturae*. 81(3): 287–299.
- Elisiario P.J., Santos G.G., Guerreiro A.R. *et al.* 1999b. Isozyme analysis revealed that the Portuguese mandarin 'Carvalhais' originated as a single clone. *Scientia Horticulturae*. 82: 145–152.
- Engelman F. 1997. In vitro conservation methods. In: Ford-Lloyd, B.V., Newbury, J.H. and Callow, J.A. (eds.) Biotechnology and Plant Genetic Resources: Conservation and Use. CABI, Wallingford, UK, pp. 119–162.

- Esen A. et Soost R.K. 1972. Tetraploid progenies from 2x X4x crosses of Citrus and their origin. Journal of the American Society for Horticultural Science. 97: 410-414.
- Esen A., Soost R.K. and Geraci G. 1979. Genetic evidence for the origin of diploid megagametophytes in Citrus. Journal of Heredity. 70: 5-8.
- Espinosa-Ruiz A., Belles J.M., Serrano R. & Culiañez-Macia F.A. 1999. *Arabidopsis thaliana* AtHal3: a flavoprotein related to salt and osmotic tolerance and plant growth. Plant J. 20: 529-539.
- Eveno E. 2008. L'adaptation à la sécheresse chez le pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.): patrons de diversité et différenciation nucléotidiques de gènes candidats et variabilité de caractères phénotypiques. Thèse de doctorat. Université Bordeaux 1. 391p.
- Fagoaga C., Rodrigo I., Conejero V. *et al.* 2001. Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5 Molecular Breeding. 7: 175–185.
- Fagoaga C., Lopez C., de Mendoza A.H. *et al.* 2006. Post-transcriptional gene silencing of the p23 silencing suppressor of Citrus tristeza virus confers resistance to the virus in transgenic Mexican lime. Plant Molecular Biology. 60:153–165.
- Fanciullino A.L., Dhuique-Mayer C., Luro F., Casanova J., Morillon R., Ollitrault P. 2006. Carotenoid diversity in cultivated citrus is highly influenced by genetic factors. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54: 4397-4406.
- Fanciullino A.L., Dhuique-Mayer C., Luro F., Morillon R., Ollitrault P. 2007. Carotenoid Biosynthetic Pathway in the *Citrus* Genus: Number of Copies and Phylogenetic Diversity of Seven Genes. J. Agric. Food Chem. 55(18): 7405 -7417. 10.1021/jf070711h S0021-8561(07)00711-X.
- Fang D.Q. et Roose M.L. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. Theor. Appl. Genet. 95: 408–417.
- Fang D.Q., Krueger R.R. and Roose M.L. 1998. Phylogenetic relationships among selected Citrus germplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Journal of the American Society of Horticulture Science. 123: 612–617.
- FAO, 1997. Water Resources of the Near East Region: A Review. Rome.
- FAO, 2004. L'eau, l'agriculture et l'alimentation. Une contribution au rapport mondial sur la mise en valeur des ressources en eau. Archives de documents de la FAO. ISBN 92-5-204943-6.
- FAO, 2005. Aquastat. Tunisie. <http://www.fao.org/nr/water/aquastat/countries/tunisia/indexfra.stm>
- FAO, 2006. Citrus Fruit fresh and processed. CCP.CI/ST/2006, FAO. 47 p.
- FAO, 2008. Vingt-neuvième conférence régionale de la FAO pour le Proche-Orient. Changement climatique: conséquences pour l'agriculture au Proche-Orient. FAO 2008. 16 p.
- FAO, Nations Unies, World Resources Institute (WRI). 2008. Disponibilité en eau douce. United Nations Environment Programme & Philippe Rekacewicz (Le Monde diplomatique).
- FAO, 2012. FAOSTAT.fao.org
- Febres V. J., Lee R. F. & Moore G. A. 2008. Transgenic resistance to Citrus Tristeza Virus in grapefruit. Plant Cell Reports. 27(1): 93-104.
- Federici C.T., Fang D.Q., Scora R.W. and Roose M.L. 1998. Phylogenetic relationships within the genus Citrus (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. Theor. Appl. Genet. 96: 812–822.
- Felle H. 1994. The H⁺/Cl⁻ symporter in root-hair cells of *Sinapis alba*. An electrophysiological study using ion-selective microelectrodes. Plant Physiol. 106:1131–36.

- Ferguson M.E., Burrow M. *et al.* 2004. Microsatellite identification and characterization in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Theor. Appl. Genet.* 108: 1064-1070.
- Ferrante S.P., Lucretti S., Reale S. *et al.* 2010. Assessment of the origin of new citrus tetraploid hybrids ($2n=4x$) by means of SSR markers and PCR based dosage effects. *Euphytica*. 173:223-233.
- Flowers T.J. 2004. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 55(396) : 307-319.
- Flowers T.J. et Flowers S.A. 2005. Why does salinity pose such a difficult problem for plant breeders? *Agricultural Water Management*. 78: 15-24.
- Flowers T.J., Hajibagheri M.A., Clipson N.J.W. 1986. Halophytes. *Q. Rev. Biol.* 61:313-37.
- Foolad M.R. 2004. Recent advances in genetics of salt tolerance in tomato. *Review of Plant Biotechnology and Applied Genetics. Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 76: 101-119.
- Foolad M.R. & Chen F.Q. 1999. RFLP mapping of QTLs conferring salt tolerance during vegetative stage in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 99: 235-243.
- Forner J.B., Forner-Giner M.A. and Alcaide A. 2003. Forner-Alcaide 5 and Forner-Alcaide 13: Two new citrus rootstocks released in Spain. 38: 629-630.
- Forner-Giner M.A., Alcaide A., Primo-Millo E. et Forner J.B. 2003. Performance of 'Navelina' orange on 14 rootstocks in northern Valencia (Spain). *Sci. Hort.* 98:223-232.
- Forner-Giner M. A., Primo-Millo E., Forner J. B. 2009. Performance of Forner-Alcaide 5 and Forner-Alcaide 13, hybrids of Cleopatra mandarin \times *Poncirus trifoliata*, as salinity-tolerant citrus rootstocks. *Journal of the American Pomological Society*. 63(2): 72-80.
- Fraile-Escanciano A., Kamisugi Y. *et al.* 2010. The SOS1 transporter of *Physcomitrella patens* mediates sodium efflux in planta. *New Phytol.* 188: 750-761. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03405.x.
- Fricke W., Akhiyarova G. *et al.* 2004. Rapid and tissue-specific changes in ABA and in growth rate response to salinity in barley leaves. *J. Exp. Bot.* 55:1115-23.
- Froelicher Y. 1999. Organisation de la diversité dans le genre *Clausena* Burm.F. (Rutaceae). Doctorat, Paris XI, Orsay, France.
- Froelicher Y., Luro F. and Ollitrault P. 2000. Analysis of meiotic behavior of the tetraploid *Clausena excavata* species by molecular marker segregation studies. In: *Proceedings of the Ninth International Citrus Congress*. International Society of Citriculture, Orlando, Florida, 210 p.
- Froelicher Y., Bassene J.B., Jedidi-Neji E., Morillon R., Bernardini G., Costantino G., Ollitrault P. 2007. Induced parthenogenesis in mandarin: induction procedures and genetic analysis of plantlets. *Plant Cell Rep.* 26(7): 937-944.
- Froelicher Y., Dambier D., Bassene J.B., Costantino G., Lotfy S., Didout C., Beaumont V., Brottier P., Risterucci A.M., Luro F. and Ollitrault P. 2008. Characterization of microsatellite markers in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco). *Molecular Ecology Resources*. 8(1): 119-122.
- Froelicher Y., Mouhaya W., Bassene J.B., Costantino G., Kamiri M., Luro F., Morillon R., Ollitrault P. 2011. New universal mitochondrial PCR markers reveal new information on maternal citrus phylogeny. *Tree Genetics and Genomes*. 7(1): 49-61. <http://dx.doi.org/10.1007/s11295-010-0314-x>
- Frost H.B. et Soost R.K. 1968. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In *The Citrus Industry*. Volume 1. Edited by: Reuther W, Batchelor LD, Webber HJ. Berkeley, California: University of California Press; pp. 290-324.
- Fu C.H., Chen C.L., Guo W.W., Deng X.X. 2004. GISH, AFLP and PCR-RFLP analysis of an intergeneric somatic hybrid combining Goutou sour orange and *Poncirus trifoliata*. *Plant Cell Reports*. 23(6): 391-396.

- Fu D., Huang B. *et al.* 2007. Overexpression of barley *hva1* gene in creeping bentgrass for improving drought tolerance. *Plant Cell Rep.* 26: 467-477.
- Fu B., Chen M. *et al.* 2010. The rapid generation of chimerical genes expanding protein diversity in zebrafish. *BMC Genomics*. 11: 657. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-11-657>.
- Fukuda A., Nakamura A., Tanaka Y. 1999. Molecular cloning and expression of the Na⁺/H⁺ exchanger gene in *Oryza sativa*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1446 (1-2): 149-55.
- Gallesio G. 1811. *Traité du Citrus*. Libr. L. Fantin, Paris.
- García M.R., Asins M.J. and Carbonell E.A. 2000. QTL analysis of yield and seed number in *Citrus*. *Theor. Appl. Genet.* 101:487-493.
- García R., Asins M.J., Forner J. and Carbonell E.A. 1999. Genetic analysis of apomixis in *Citrus* and *Poncirus* by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 99: 511-518.
- García A-B., de Almeida Engler J. *et al.* 1997. Effects of osmoprotectants upon NaCl stress in rice. *Plant Physiol.* 115: 159–169.
- García-Agustín P. et Primo-Millo E. 1995. Selection of a NaCl-tolerant *Citrus* plant. *Plant Cell Reports*. 14: 314-318.
- García-Lidon A., Ortiz J.M. *et al.* 1998. Role of rootstock and scion on root and leaf ion accumulation in lemon trees grown under saline conditions. *Fruits*. 53:89–97.
- García-Lor A., Luro F., Navarro L., Ollitrault P. 2012. Comparative use of InDel and SSR markers in deciphering the interspecific structure of cultivated citrus genetic diversity: a perspective for genetic association studies. *Molecular Genetics and Genomics*. 287: 77-94.
- García-Lor A., Curk F., Snoussi-Trifa H., Morillon R., Ancillo G., Luro F., Navarro L. and Ollitrault P. 2013. A nuclear phylogenetic analysis: SNPs, indels and SSRs deliver new insights into the relationships in the ‘true citrus fruit trees’ group (Citrinae, Rutaceae) and the origin of cultivated species. *Annals of Botany*. pp. 1-19. doi:10.1093/aob/mcs227
- García-Sánchez F., Jifon J.L. *et al.* 2002. Gas exchange, chlorophyll and nutrient contents in relation to Na⁺ and Cl⁻ accumulation in ‘Sunburst’ mandarin grafted on different rootstocks. *Plant Science*. 162: 705-712.
- García-Sánchez F., Carvajal M., Porras I. *et al.* 2003. Effects of salinity and rate of irrigation on yield, fruit quality and mineral composition of ‘Fino 49’ lemon. *Europ. J. Agronomy*. 19: 427-437.
- García-Sánchez F., Perez-Perez J.G. *et al.* 2006. The response of young mandarin trees grown under saline conditions depends on the rootstock. *Europ. J. Agronomy*. 24: 129–139.
- Gaxiola R.A., Li J.S. *et al.* 2001. Drought- and salt- tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11444–49.
- Gaxiola R.A., Rao R. *et al.* 1999. The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1480-1485.
- Genc Y., McDonald G.K., Tester M. 2007. Re-assessment of tissue Na⁺ concentration as a criterion for salinity tolerance in bread wheat. *Plant Cell Environ.* 30:1486–1498.
- Genc Y., Oldach K. *et al.* 2010. Sodium exclusion QTL associated with improved seedling growth in bread wheat under salinity stress. *Theor. Appl. Genet.* 121:877–894.
- Gentile A., LaMalfa S., Deng Z.N., Domina F., Nicolosi E. and Tribulato E. 1998. Transgenic citrus: first experiences with Rol genes. *Rivisti di Frutticoltura e di Ortofloricoltura* 61: 59–61.
- Georgiou A. 2002. Evaluation of rootstocks for 'Clementine' mandarin in Cyprus. *Scientia Horticulturae*. 93: 29-38.

- Geraci G., Esen A. and Soost R.K. 1975. Triploid progenies from 2x X2x crosses of Citrus cultivars. *Journal of Heredity*. 66: 177-178.
- Giancola S., McKhann H.I. *et al.* 2006. Utilization of the three high-throughput SNP genotyping methods, the GOOD assay, Amplifluor and TaqMan, in diploid and polyploid plants. *Theor. Appl. Genet.* 112: 1115–1124.
- GIFruits. 2009-2012. Données sur le secteur des agrumes en Tunisie. <http://www.gifruit.nat.tn/>
- Gil-Izquierdo A., Riquelme M.T. *et al.* 2004. Effect of the Rootstock and Interstock Grafted in Lemon Tree (*Citrus limon* (L.) Burm.) on the Flavonoid Content of Lemon Juice. *J. Agric. Food Chem.* 52: 324–331.
- Jimeno V., Syvertsen J.P., Nieves M. *et al.* 2009. Orange varieties as interstocks increase the salt tolerance of lemon trees. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 84(6): 625–631.
- Jimeno V., Syvertsen J. P. *et al.* 2010. Growth and mineral nutrition are affected by substrate type and salt stress in seedlings of two contrasting citrus rootstocks. *J. Plant Nutr.* 33:1435-1447.
- Giroux M.J., Morris C.F. 1997. A glycine to serine change in puroindoline b is associated with wheat grain hardness and low levels of starch-surface friabilin. *Theor. Appl. Genet.* 95:857–864.
- Gmitter Jr.F.G., Deng X.X., Hearn C.J. 1992. Cytogenetic mechanism underlying reduced fertility and seedlessness in *Citrus*. *Proc. VIIth Int. Soc. Citric.* 1:125–129.
- Gmitter Jr. F.G., Deng Z. and Chen C. 2007. Cloning and characterization of disease resistance genes. In: I.A. Khan (ed.). *Citrus genetics, breeding and biotechnology*. CAB International, Wallingford, pp. 287–305.
- Gmitter Jr. F.G., Xiao S.Y., Huang S., Hu X.L., Garnsey S.M. and Deng Z. 1996. A localized linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region. *Theor. Appl. Genet.* 92: 688–695.
- Gmitter Jr. F.G., Chen C., Machado M.A. *et al.* 2012. Citrus genomics. *Tree Genetics & Genomes*. DOI 10.1007/s11295-012-0499-2
- Goff S. A. *et al.* 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science*. 296: 92–100.
- Golein B., Koltunow A.M. *et al.* 2005. Isolation and characterization of microsatellites loci in the lemon (*Citrus limon*). *Molecular Ecology Notes*. 5(2): 253-255.
- Gómez-Cadenas A., Iglesias D.J., *et al.* 2003. Physiological and molecular responses of citrus to salinity. *Recent Research Developments in Plant Molecular Biology*.1: 281–298.
- González-Arno M.T., Engelmann F., Urrea C., Morenza M. and Rios A. 1988. Cryopreservation of citrus apices using the encapsulation-dehydration technique. *CryoLetters*. 19: 177-182.
- González-Arno M.T., Juárez J., Ortega C., Navarro L. and Duran-Vila N. 2003. Cryopreservation of ovules and somatic embryos of citrus using the encapsulation-dehydration technique. *CryoLetters*. 24: 85–94.
- González-Martínez S.C., Wheeler N.C. *et al.* 2006. Association Genetics in *Pinus taeda* L. I. Wood Property Traits. *Genetics*. 175: 399–409.
- Gonzalez-Mas M.C., Llosa M.J. *et al.* 2009. Rootstock effects on leaf photosynthesis in “Navelina” trees grown in calcareous soil. *HortScience*. 44: 280–283.
- Goren R. et Goldschmidt E.E. 2000. Proceedings of the First International Symposium on Citrus Biotechnology. *Acta Horticulturae*. 535: 263.
- Gorham J. et Wyn Jones R.G. 2002. Genetics of salinity responses and plant breeding. In: *Salinity: Environment–Plants–Molecules*. Läuchli A., Lüttge U. (eds.). Dordrecht, the Netherlands: Kluwer, 451–489.
- Gorham J., Wyn Jones R.G., Bristol A. 1990. Partial characterization of the trait for enhanced K⁺-Na⁺ discrimination in the D genome of wheat. *Planta*. 180: 590–597.

- Gorham J., Bridges J. *et al.* 1997. Genetic analysis and physiology of a trait for enhanced K^+/Na^+ discrimination in wheat. *New Phytol.* 137.
- Goudet J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- Green R.M., Vardi A., Galun E. 1986. The plastome of *Citrus*: physical map, variation among *Citrus* cultivars and species and comparaison with related genera. *Theor. Appl. Genet.* 72: 170-177.
- Grivet L. & Noyer J.L. 1999. Les méthodes de marquage biochimique et moléculaire. In: Hamon P., Seguin M., Perrier X. & Glaszmann J.C. (eds.) *Diversité génétique des plantes tropicales cultivées*. CIRAD, pp. 13-42.
- Grosser J.W. et Chandler J.L. 2003. New Citrus rootstocks via protoplast fusion. *Acta Horticulturae* 622: XXVI International Horticultural Congress: Genetics and Breeding of Tree Fruits and Nuts: pp. 491-497.
- Grosser J.W. et Gmitter F.G. Jr. 2010. Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: applications for scion and rootstock breeding in citrus. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* doi:10.1007/s11240-010-9823-4.
- Grosser, J.W., Gmitter, F.G., Fleming, G.H. and Chandler, J.L. 1998. Application of biotechnology to citrus cultivar improvment at the Citrus Research and Education Center. *Acta Horticulturae*. 535: 213-220.
- Grosser J.W., Ollitrault P. and Olivares-Fuster O. 2000. Somatic hybridization in *Citrus*: an effective tool to facilitate variety improvement. *In Vitro Cellular and Development Biology Plant.* 36: 434-449.
- Grosser J.W., Medina-Urrutia V., Ananthakrishnan G., Serrano P. 2004. Building a replacement sour orange rootstock: Somatic hybridization of selected mandarin plus pummelo combinations. *Journal of the American Society for Horticultural Science.* 129: 530-534.
- Grosser J.W., Hyum J.A., Calovic M. *et al.* 2010. Production of new allotetraploid and autotetraploid Citrus breeding parents: focus on zipperskin mandarins. *HortScience.* 45: 1160-1163.
- Grover A. *et al.* 2007. Biased distribution of microsatellites motifs in the rice genome. *Mol. Genet. Genomics.* 277: 469-480.
- Guillaumie S., Charmet G. *et al.* 2004. Co-location between a gene encoding for the bZip factor SPA and an eQTL for a high-molecular-weight glutenin subunit in wheat (*Triticum aestivum*). *Genome.* 47:705-713.
- Gulsen O. et Roose M.L. 2001a. Chloroplast and nuclear genome analysis of the parentage of lemons. *J Amer Soc Hort Sci.* 126: 210-215.
- Gulsen O. and Roose M.L. 2001b. Lemons: diversity and relationships with selected Citrus genotypes as measured with nuclear genome markers. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 126: 309-317.
- Gulsen O., Uzun A. *et al.* 2010. A new citrus linkage map based on SRAP, SSR, ISSR, POGP, RGA and RAPD markers. *Euphytica.* 173:265-277.
- Guo W.W. et Grosser J.W. 2005. Somatic hybrid vigor in *Citrus*: Direct evidence from protoplast fusion of an embryogenic callus line with a transgenic mesophyll parent expressing the GFP gene. *Plant Science.* 168: 1541-1545.
- Guo W. W., Cheng Y.J., Deng X.X. 2002. Regeneration and molecular characterization of intergeneric somatic hybrids between *Citrus reticulata* and *Poncirus trifoliata*. *Plant Cell Rep.* 20: 829-834.
- Guo W.W., Cheng Y.J. *et al.* 2004. Molecular characterization of several intergeneric somatic hybrids between *Citrus* and its related genera. *ISHS Acta Horticulturae* 632: XXVI International Horticultural Congress: Citrus and other subtropical and tropical Fruit Crops: Issues, advances and opportunities.
- Guo W.W., Duan Y., Olivares-Fuster O. *et al.* 2005. Protoplast transformation and regeneration of transgenic Valencia sweet orange plants containing a juice quality-related pectin methylesterase gene. *Plant Cell Reports.* 24: 482-486.
- Guo W.W., Cheng Y.J. *et al.* 2006. Molecular analysis revealed autotetraploid, diploid and tetraploid cybrid plants regenerated from an interspecific somatic fusion in *Citrus*. *Scientia Horticulturae.* 108: 162-166.

- Gutiérrez-E M. A., Luth D. & Moore G. A. 1997. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in *Citrus* and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the Coat Protein Gene of Citrus Tristeza Virus. *Plant Cell Reports*. 16(11): 745-753.
- Hajlaoui H., Denden M. & Bouslama M. 2007. Etude de la variabilité intraspécifique de tolérance au stress salin du pois chiche (*Cicer arietinum* L.) au stade germination. *Tropicultura*. 25(3): 168-173.
- Halkett F., Simon J.C. et Balloux F. 2005. Tackling the population genetics of clonal and partially clonal organisms. *Trends Ecol. Evol.* 20: 194-201. doi:10.1016/j.tree.2005.01.001. PMID:16701368.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95 – 98.
- Harry M. 2001. Génétique moléculaire et évolutive, Collection "Sciences Fondamentales", Maloine, Paris, 300 illustrations, 326p.
- Hasegawa M., Kishino H., Yano T. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA . *J. Mol. Evol.* 22:160–174.
- Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J-K., Bohnert H.J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51:463–99.
- Hassani A., Dellal A., Belkhodja M., Kaid- Harche M. 2008. Effet de la salinite sur l'eau et certains osmolytes chez l'orge (*Hordeum Vulgare*). *European Journal of Scientific Research*. 23(1): 61-69.
- Hauser F. et Horie T. 2010. A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters: a mechanism for sodium exclusion and maintenance of high $K^{(+)}/Na^{(+)}$ ratio in leaves during salinity stress. *Plant Cell Environ.* 33: 552–565.
- He C., Poysa V., Yu K. 2003a. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in determining relationships among *Lycopersicon esculentum* cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 106: 363-373.
- He G.H., Meng R.H., Newman M. *et al.* 2003b. Microsatellites as DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). *BMC Plant Biol.* 3: 3.
- He G., Meng R., Gao H. *et al.* 2005. Simple sequence repeat markrs for botanical varieties of cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Euphytica*. 142: 131-136.
- Hechenberger M., Schwappach B. *et al.* 1996. A family of putative chloride channels from *Arabidopsis* and functional complementation of a yeast strain with a CLC gene disruption. *J. Biol. Chem.* 271(52): 33632-8.
- Herrero R., Asins M.J., Carbonell E.A. and Navarro L. 1996a. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. I. Intraspecies and intragenus genetic variability. *Theoretical and Applied Genetics*. 92 (5): 599-609.
- Herrero R., Asins M.J., Pina J.A., Carbonell E.A. and Navarro L. 1996b. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. II. Genetic relationships among genera and species. *Theoretical and Applied Genetics*. 93: 1327-1334.
- Hervieu B. 2001. Préface, In Jouve A.M. (ed.). *Terres méditerranéennes: le morcellement, richesse ou danger?* Paris (France): Karthala, CIHEAM-IAMM, pp.7-9.
- Heuertz M., De Paoli E. *et al.* 2006. Multilocus patterns of nucleotide diversity, linkage disequilibrium and demographic history of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst]. *Genetics*. 174: 2095 – 2105.
- Hidaka T., Omura M. *et al.* 1990. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Citrus* spp. From suspension cells. *Japan Journal of Breeding*, Tokyo. 40(2): 199-207.

- Hodgson R.W. 1967. Horticultural varieties of *Citrus*. In: Reuther W, Webber HJ. and Batchelor LD. (eds), The Citrus Industry, vol I. University of California, USA. pp. 431-591.
- Hong Z., Lakkineni K. *et al.* 2000. Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol.* 122: 1129-1136.
- Hörandl E. et Paun O. 2007. Patterns and sources of genetic diversity in apomictic plants: implications for evolutionary potentials. In *Apomixis: evolution, mechanisms and perspectives*. Edited by: Hörandl E, Grossniklaus U, Van Dijk PJ, Sharbel TF. Koenigstein. Germany; 169-194.
- Horie T. et Schroeder J.I. 2004. Sodium Transporters in Plants. Diverse Genes and Physiological Functions. Update on Na⁺ Transporters in Plants. *Plant Physiology*. 136: 2457–2462.
- Hoskins R.A., Phan A.C. *et al.* 2001. Single nucleotide polymorphism markers for genetic mapping in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*. 1(1): 1100-1113.
- Huang Y., Zhang G., Wu F. *et al.* 2006. Differences in physiological traits among salt-stressed barley genotypes. *Commun Soil Sci. Plant Anal.* 37: 567–570.
- Huang S., Spielmeier W., Lagudah E.S. *et al.* 2008. Comparative mapping of HKT genes in wheat, barley, and rice, key determinants of Na⁺ transport, and salt tolerance. *J. Exp. Bot.* 59: 927–937.
- Husain S., Munns R., Condon A.G. 2003. Effect of sodium exclusion on chlorophyll retention and growth of durum wheat in saline soil. *Aust. J. Agric. Res.* 54: 589–597.
- Hussain S., Luro F., Costantino G., Ollitrault P., Morillon R. 2012. Physiological analysis of salt stress behaviour of citrus species and genera: low chloride accumulation as an indicator of salt tolerance. *South African Journal of Botany*. 81: 103–112.
- Iglesias D.J., Levy Y. *et al.* 2004. Nitrate improves growth in salt-stressed citrus seedlings through effects on photosynthetic activity and chloride accumulation. *Tree Physiol.* 24(9): 1027–1034.
- Iglesias D.J., Cercós M., Colmenero-Flores J.M. *et al.* 2007. Physiology of citrus fruiting. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 19: 333–362.
- Ingvarsson P.K. 2005. Nucleotide polymorphism and linkage disequilibrium within and among natural populations of European aspen (*Populus tremula* L., Salicaceae). *Genetics*. 169: 945 – 953.
- Ingvarsson P.K. 2007. Gene expression and protein length influence codon usage and rates of sequence evolution in *Populus tremula*. *Mol. Biol. Evol.* 24(3): 836-44.
- Ingvarsson P.K. 2008. Multilocus patterns of nucleotide polymorphism and the demographic history of *Populus tremula*. *Genetics*. 180(1): 329-40. doi: 10.1534/genetics.108.090431.
- Ishitani M., Liu J.P., Halfter U. *et al.* 2000. SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *Plant Cell*. 12: 1667–77.
- Iwamasa M., Nito N., and Ling J.T. 1988. Intra et intergeneric hybridization in the orange subfamily, *Aurantioideae*. *Proc. 6th Int. Soc. Citric. Cong.*, Balaban, Philadelphia. 1: 123-130.
- Iwasaki T. 1943. On the big and small leaf strain of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.). *Journal of the Horticultural Association of Japan*. 14: 302-305.
- Janicka-Russak M. et Klobus G. 2006. Modification of plasma membrane and vacuolar H⁺ -ATPases in response to NaCl and ABA. *J. Plant Physiol.* 164(3): 295-302.
- Jarrell D.C., Roose M.L., Traugh S.N., Kupper R.S. 1992. A genetic map of citrus based on the segregation of isozymes and RFLPs in an intergeneric cross. *Theor. Appl. Genet.* 84:49–56.
- Jenks M. A., Hasegawa P.M. *et al.* 2007. Recent advances in breeding citrus for drought and saline stress tolerance. In *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*. Springer Netherlands. pp. 627-642.

- Jin L., Lu Y., Xiao P. *et al.* 2010. Genetic diversity and population structure of a diverse set of rice germplasm for association mapping. *Theor. Appl. Genet.* 121:475–487. DOI 10.1007/s00122-010-1324-7.
- Jouve A.M. 2001. *Terres méditerranéennes: le morcellement, richesse ou danger?* Paris (France) : Karthala (Economie et Développement), CIHEAM-IAMM, 264 p.
- Jung Y.H., Kwon H.M., Kang S.H. *et al.* 2005. Investigation of the phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related species in Korea using plastid trnL-trnF sequences. *Scientia Horticulturae*. 104: 179–188.
- Jyothsnakumari G., Thippeswamy M. *et al.* 2009. Differential expression of *LEA* proteins in two genotypes of mulberry under salinity. *Biol. Plantarum*. 53:145–150.
- Kaeuffer M.R. 2008. Dynamique de la diversité génétique et effets fondateurs: l'exemple du mouflon (*Ovis Aries*) de Kerguelen. Thèse de doctorat en Biologie. Université du Québec À Montréal. 261 p.
- Kaneyoshi J., Kobayashi S. *et al.* 1994. A simple and efficient gene transfer system of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.). *Plant Cell Reports*, New York. 13(10): 541-545.
- Kashi Y., King D.G., Soller M. 1997. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends in Genetics*. 13: 74-78.
- Kasuga M., Liu Q., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K. & Shinozaki K. 1999. Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat. Biotechnol.* 17: 287-291.
- Katiyar-Agarwal S., Zhu J., Kim K. *et al.* 2006. The plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 interacts with RCD1 and functions in oxidative stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 18816–18821.
- Kato M., Ikoma Y. *et al.* 2004. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiology*. 134: 824 – 837.
- Kaviani B. 2008. Proline accumulation and growth of soybean callus under salt and water stress. *International Journal of Agriculture and Biology*. 10: 221-223.
- Kepiro J.L. and Roose M.L. 2007. Nucellar embryony. In: Khan I.A. (ed.). *Citrus genetics, breeding, and biotechnology*. Wallingford, UK: CAB International, pp. 141-150.
- Kepiro J.L. and Roose M.L. AFLP markers closely linked to a major gene essential for nucellar embryony (apomixis) in *Citrus maxima* × *Poncirus trifoliata*. 2010. *Tree Genetics & Genomes*. 6:1-11.
- Khan I.A. et Roose M.L. 1988. Frequency and characteristics of nucellar and zygotic seedlings in three cultivars of trifoliolate orange. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 113: 105-110.
- Khan I.A. & Grosser J.W. 2004. Regeneration and characterization of somatic hybrid plants of *Citrus sinensis* (sweet orange) and *Citrus micrantha*, a progenitor species of lime. *Euphytica*. 137: 271–278.
- Khan I.A. et Kender W.J. 2007. *Citrus breeding*. In: Khan I.A. ed. *Citrus genetics, breeding, and biotechnology*. Wallingford, UK: CAB International, p.1-8.
- Khan E.U., Fu X.Z., Liu J.H. 2012. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and regeneration of transgenic plants using leaf segments as explants in Valencia sweet orange. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 109:383–390.
- Kijas J.M.H., Fowler J.C.S., Thomas M.R. 1995. An evaluation of sequence-tagged microsatellite-site markers for genetic analysis within *Citrus* and related species. *Genome*. 38: 349-355.
- Kijas J. M. H., Thomas M.R., Fowler J. C. S., Roose M.L. 1997. Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of *Citrus*. *Theor. Appl. Genet.* 94: 701-706.
- King M.W., Soetisna U. and Roberts E.H. 1981. The dry storage of *Citrus* seeds. *Annals of Botany*. 48: 865–872.
- Kirst M., Cordeiro C.M. *et al.* 2005. Power of Microsatellite Markers for Fingerprinting and parentage Analysis in *Eucalyptus grandis* Breeding Populations. *Journal of Heredity*. 96(2): 161–166. doi:10.1093/jhered/esi023.

- Kishitani S., Takanami T. *et al.* 2000. Compatibility of glycinebetaine in rice plants: evaluation using transgenic rice plants with a gene for peroxisomal betaine aldehyde dehydrogenase from barley. *Plant Cell Environ.* 23: 107-114.
- Kobayashi S. et Uchimiya H. 1989. Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts by direct DNA transfer. *Japanese Journal of Genetics, Shizuoka.* 64(2): 91-97.
- Kobayashi S., Ieda I., Nakatani M. 1981. Role of the primordium cell in nucellar embryogenesis in citrus. In: *Proceedings of 4th International Citrus Congress.* Tokyo: International Society of Citriculture. pp. 44-48.
- Koca U., Berhow M.A., Febres V.J. *et al.* 2009. Decreasing unpalatable flavonoid components in *Citrus*: the effect of transformation construct. *Physiologia Plantarum.* 137: 101-114.
- Koltunow A.M., Brennan P., Protosaltis S. and Nito N. 2000. Regeneration of West Indian limes (*Citrus aurantifolia*) containing genes for decreased seed set. *Acta Horticulturae.* 535: 81-91.
- Koyama M.L., Levesley A., Koebner R.M.D. *et al.* 2001. Quantitative trait loci for component physiological traits determining salt tolerance in rice. *Plant Physiol.* 125: 406-422.
- Krapivinsky G.B., Ackerman M.J. *et al.* 1994. Molecular characterization of a swelling-induced chloride conductance regulatory protein PI(Cln). *Cell.* 76: 439-448.
- Krueger R.R. & Navarro L. 2007. Citrus Germplasm resources. In: Khan I.A. ed. *Citrus genetics, breeding, and biotechnology.* Wallingford, UK: CAB International, pp. 45-140.
- Krug C.A. 1943. Chromosomes numbers in the subfamily Aurantioideae with special reference to the genus *Citrus*. *Botanical Gazette.* 48: 602-611.
- Külheim C., Yeoh S.H., Maintz J., Foley W.J., Moran G.F. 2009. Comparative SNP diversity among four *Eucalyptus* species for genes from secondary metabolite biosynthetic pathways. *BMC Genomics.* 24(10): 452.
- Kutil B.L. and Williams C.G. 2001. Triplet-Repeat Microsatellites Shared Among Hard and Soft Pines. *J. Hered.* 92(4): 327-332. doi: 10.1093/jhered/92.4.327.
- Kyndt T., Dung T.N., Goetghebeur P. *et al.* 2010. Analysis of ITS of the rDNA to infer phylogenetic relationships among Vietnamese *Citrus* accessions. *Genet. Resour. Crop Evol.* 57:183-192. DOI 10.1007/s10722-009-9460-0
- Laborem G., Wagner M., Reyes F. 1995. Concentración de prolina como indicador de déficit hídrico en tres patrones cítricos. Trabajo de ascenso. Universidad Rómulo Gallegos (Unerg), San Juan de Los Morros (Venezuela). pp.30.
- Ladaniya M.S. 2008. *Citrus Fruit. Biology, Technology and Evaluation.* San Diego, USA : Academic Press, 558 p.
- LaMalfa S., Gentile A., Deng Z.N. and Domina F. 2000. Citrus genetic transformation with a vital reporter gene: expression of green fluorescent protein in Troyer citrange. *Italus Hortus.* 7: 17-21.
- Lan W., Wang W. *et al.* 2010. A rice high-affinity potassium transporter (HKT) conceals a calcium-permeable cation channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 107: 7089.
- Lazrek F. 2008. Analyse de la diversité génétique et symbiotique des populations naturelles tunisiennes de *Medicago truncatula* et recherche de QTL liés au stress salin. Thèse de doctorat. Université Toulouse III - Paul Sabatier. 254pp.
- Ledford H.K. & Niyogi K.K. 2005. Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. *Plant, Cell and Environment.* 28: 1037-1045.
- Lee S.Y., Ahn J.H., Cha Y.S. *et al.* 2007. Mapping QTLs related to salinity tolerance of rice at the young seedling stage. *Plant Breed.* 126: 43-46.

- Leidi E.O., Barragán V. *et al.* 2010. The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato. *The Plant Journal*. 61: 495-506.
- Levigneron A., Lopez F. *et al.* 1995. Les plantes face au stress salin. *Cahiers Agricultures*. 4: 263-73.
- Levy Y. et Shalhevet J. 1990. Ranking the salt tolerance of citrus rootstocks by juice analysis. *Sci. Hortic.* 45: 89-98.
- Levy Y. & Syvertsen J.P. 2004. Irrigation water quality and salinity effects in citrus trees. In *Horticultural Reviews* (ed.J.Janick), pp.37–82.AVI, Westport, CT, USA.
- Levy H., Shalhevet J., Lifshitz J. 1992. The effect of salinity on citrus rootstocks and scions. In: *Proc. Int. Soc. Citric. Acireale, Italy*. pp. 391-396.
- Li Z.M., Zhang J.Z., Mei L. *et al.* 2010. *PtSVP*, an *SVP* homolog from trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.), shows seasonal periodicity of meristem determination and affects flower development in transgenic *Arabidopsis* and tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 74:129–142.
- Li Y., Haseneyer G. *et al.* 2011. High levels of nucleotide diversity and fast decline of linkage disequilibrium in rye (*Secale cereale* L.) genes involved in frost response. *BMC Plant Biology*. 11:6. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-11-6>.
- Lijavetzky D., Cabezas J. *et al.* 2007. High throughput SNP discovery and genotyping in grapevine (*Vitis vinifera* L.) by combining a re-sequencing approach and SNPlex technology. *BMC Genomics*. 8: 424.
- Lin H.X., Zhu M.Z., Yano M. *et al.* 2004. QTLs for Na⁺ and K⁺ uptake of the shoots and roots controlling rice salt tolerance. *Theor. Appl. Genet.* 108: 253–260.
- Lindsay M.P., Lagudah E.S., Hare R.A., Munns R. 2004. A locus for sodium exclusion (Nax1), a trait for salt tolerance, mapped in durum wheat. *Functional Plant Biology*. 31: 1105–1114.
- Linneus C. 1753. *Species Plantarum*. Holmiae, Stockholm.
- Liou P.C. Gmitter Jr F.G., Moore G.A. 1996. Characterization of the *Citrus* Genome through analysis of restriction fragment length polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.* 92:425-435.
- Liu W., Fairbairn D.J., Reid R.J. and Schachtman D.P. 2001. Characterization of two HKT1 homologues from *Eucalyptus camaldulensis* that display intrinsic osmosensing capability. *Plant Physiol.* 127(1): 283-294.
- Liu H.U.A., Wang Q. *et al.* 2008. Transgenic salt-tolerant sugar beet (*Beta vulgaris* L.) constitutively expressing an *Arabidopsis thaliana* vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene, AtNHX3, accumulates more soluble sugar but less salt in storage roots. In: *Blackwell Publishing Ltd*. pp. 1325-1334.
- Lloyd J., Kriedemann P. et Aspinall D. 1990. Contrasts between *Citrus* species in response to salinization: An analysis of photosynthesis and water relations for different rootstock-scion combinations. *Physiol. Plant.* 78:236-246.
- Lo E.Y.Y., Stefanović S. *et al.* 2010. Fine-scale comparisons of genetic variability in seed families of asexually and sexually reproducing *Crataegus* (Hawthorn; Rosaceae). *American Journal of Botany*. 97(6): 1014–1024.
- Loeppert R.H. 1986. Reactions of iron and carbonates in calcareous soils. *Journal of plant nutrition*. 9(3-7): 195-214.
- Lohaus G., Hussmann M., Pennewiss K. *et al.* 2000. Solute balance of a maize (*Zea mays* L.) source leaf as affected by salt treatment with special emphasis on phloem retranslocation and ion leaching. *J. Exp. Bot.* 51(351): 1721-1732. doi: 10.1093/jexbot/51.351.1721.
- López-Climent M. F., Arbona V. *et al.* 2008. Relationship between salt tolerance and photosynthetic machinery performance in *Citrus*. *Environ. Exp. Bot.* 62: 176-184.

- Lotfy S., Luro F., Carreel F., Froelicher Y., Rist D., Ollitrault P. 2003. Application of cleaved amplified polymorphic sequence method for analysis of cytoplasmic genome among Aurantioideae intergeneric somatic hybrids. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 128: 225–230.
- Louzada E.S., del Rio H.S. *et al.* 2008. Evaluation of citrus rootstocks for the high pH, calcareous soils of South Texas. *Euphytica*. 164:13–18.
- Lurin C., Geelen D. *et al.* 1996. Cloning and functional expression of a plant voltage-dependent chloride channel. *The Plant Cell Online*. 8: 701.
- Luro F., Rist D., Ollitrault P. 1999. Evaluation of genetic relationships in citrus genus by means of sequence tagged microsatellites. *ISHS Acta Horticulturae* 546: International Symposium on Molecular Markers for Characterizing Genotypes and Identifying Cultivars in horticulture.
- Luro F., Rist D., Ollitrault P. 2001. Evaluation of genetic relationships in *Citrus* genus by means of sequence tagged microsatellites. In: *Proceedings of the International Symposium on molecular markers for characterizing genotypes and identifying cultivars in Horticulture: 6–8 march 2000; Montpellier*. Edited by Doré C., Dosba F., Baril C. *ISHS Acta Horticulturae*. 546: 537–542.
- Luro F., Lorieux M., Laigret F., Bové J.M., Ollitrault P. 1994. Genetic mapping of an intergeneric citrus hybrid using molecular markers. *Fruits*. 49(5-6): 404-408.
- Luro F., Lorieux M., Laigret F., Bové J.M. and Ollitrault P. 1995. Cartographie du génome des agrumes à l'aide des marqueurs moléculaires et distorsions de ségrégation. In: *INRA (ed.) Techniques et Utilisations des Marqueurs Moléculaires*. INRA, Paris, pp. 69–82.
- Luro F., Laigret F., Lorieux M., Ollitrault P. 1996. Citrus genome mapping with molecular markers: two maps obtained by segregation analysis of progeny of one intergeneric cross. *Proc. Intl. Soc. Citricult.* 2: 862–866.
- Luro F., Froelicher Y., Costantino G., Ollitrault P. 2003. Citrus STMS markers development and mapping. *Plant & Animal Genomes XI Conference. Workshop: Citrus*, 79. Town & Country convention Center, San Diego, CA.
- Luro F., Argout X., Costantino G., Froelicher Y. *et al.* 2006. Polymorphism and Position Analysis Of Dinucleotide And Trinucleotide Microsatellite Sequences Detected In Citrus Clementine cv. EST Sequences. *Plant & Animal Genome XIV Congress*, San Diego, CA.
- Luro F., Costantino G., Billot C., Froelicher Y. *et al.* 2007. Genetic maps of clementine mandarin and intergeneric hybrid clementine X poncirus using genomic and EST microsatellite markers. *Plant and Animal Genome Congress, PAGXV*, San Diego, USA.
- Luro F., Costantino G., Terol J. *et al.* 2008. Transferability of the EST-SSRs developed on Nules clementine (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other *Citrus* species and their effectiveness for genetic mapping. *BMC Genomics*. 9:287. doi:10.1186/1471-2164-9-287
- Luro F., Gatto J., Costantino G. and Pailly O. 2011. Analysis of genetic diversity in *Citrus*. *Plant Genetic Resources*. 9: 218-221.
- Luth D. & Moore G. A. 1999. Transgenic grapefruit plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 57(3): 219-222.
- Lv S.L., Zhang K.W. *et al.* 2008. Overexpression of an H⁺-PPase gene from *Thellungiella halophila* in cotton enhances salt tolerance and improves growth and photosynthetic performance. *Plant and Cell Physiology*. 49: 1150-1164.
- Ma X.F., Szmidt A.E., Wang X.R. 2006. Genetic structure and evolutionary history of a diploid hybrid pine *Pinus densata* inferred from the nucleotide variation at seven gene loci. *Mol. Biol. Evol.* 23(4): 807-816.
- Ma C., Zhang W. H., Liu X. C. 2008. Effects of iso-osmotic potential salt and water stress on the seed germination of *Periploca*. *Bulletin of Botanical Research*. 28: 465-470.
- Ma L., Zhou E., Huo N. *et al.* 2007. Genetic analysis of salt tolerance in a recombinant inbred population of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*. 153: 109–117.

- Maas E. V. 1993. Salinity and citriculture. *Tree Physiol.* 12: 195-216.
- Mabberly D.J. 2004. *Citrus* (Rutaceae): A Review of Recent Advances in Etymology, Systematics and Medical Applications. *Blumea-Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants.* 49(2-3): 481-498.
- Mademba-Sy F. 2004. Contribution à la recherche d'indicateurs physiologiques et biochimiques de la tolérance des agrumes à la salinité. Thèse de doctorat, Université de Rennes 1. 164p.
- Mademba-Sy F., Bouchereau A., Larher F.R. 2003. Proline accumulation in cultivated citrus and its relationship with salt tolerance. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology.* 78: 617-623.
- Maggio A., Raimondi G. *et al.* 2007. Salt stress response in tomato beyond the salinity tolerance threshold. *Environ. Exp. Bot.* 59: 276-282.
- Mahajan S., Pandey G. K., Tuteja N. 2008. Calcium- and salt-stress signaling in plants: Shedding light on SOS pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* 471: 146-158.
- Maiti R. K., Amaya L.E.D. *et al.* 1996. Genotypic variability in maize cultivars (*Zea mays* L.) for resistance to drought and salinity at the seedling stage. *J. Plant Physiol.* 148: 741-744.
- Malcolm C. V., Lindley V. A. *et al.* 2003. Halophyte and glycophyte salt tolerance at germination and the establishment of halophyte shrubs in saline environments. (Special Issue: Waterlogging and salinity tolerance.) *Plant and Soil.* 253: 171-185.
- Mammadov J.A., Chen W., Ren R. *et al.* 2010. Development of highly polymorphic SNP markers from the complexity reduced portion of maize [*Zea mays* L.] genome for use in marker-assisted breeding. *Theor. Appl. Genet.* 121:577–588. DOI 10.1007/s00122-010-1331-8
- Maqbool S., Zhong H. *et al.* 2002. Competence of oat (*Avena sativa* L.) shoot apical meristems for integrative transformation, inherited expression and osmotic tolerance of transgenic lines containing *HVA1*. *Theor. Applied Genet.* 105: 201-208.
- Marschner H. 1995. Mineral Nutrition in Higher Plants, 2nd edn. Academic Press, London, UK.
- Mashali A., Suarez D.L., Nabhan H. & Rabindra R. 2005. Integrated management for sustainable use of salt-affected soils. Rome: FAO Soils Bulletin.
- Matsumoto R., Okudai N., Oiyama I., Takahara T. *et al.* 1991. New citrus cultivar 'Tsunokaori'. *Belletin of the Fruit Tree Research Station.* 21: 59-65.
- Mowla S.B., Cuypers A. *et al.* 2006. Yeast complementation reveals a role for an *Arabidopsis thaliana* late embryogenesis abundant (LEA)-like protein in oxidative stress tolerance. *The Plant Journal.* 48: 743–756.
- McCouch S.R., Zhao K. *et al.* 2010. Development of genome-wide SNP assays for rice. *Breeding Science.* 60: 524–535. doi:10.1270/jsbbs.60.524.
- Melgar J., Syvertsen J. *et al.* 2008. Leaf gas exchange, water relations, nutrient content and growth in citrus and olive seedlings under salinity. *Biol. Plant.* 52: 385-390.
- Meloni D.A., Oliva M.A. *et al.* 2003. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environ. Exp. Bot.* 49: 69–76.
- Miller G., Shulaev V. and Mittler R. 2008. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiol. Plant.* 133: 481–489.
- Miranda M., Ikeda F. *et al.* 1997. Chromosome markers and alterations in mitotic cells from interspecific Citrus somatic hybrids analysed by fluorochrome staining. *Plant Cell Reports.* 16: 807-812.
- Molinari H., Bessalov J. C., Kobayashi A. K. *et al.* 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of swingle citrumelo (*Citrus paradisi* Macf. × *Poncirus trifoliata* L. Raf.) using thin epicotyl sections. *Scientia Horticulturae.* 99(3-4): 379-385.

- Moons A., Bauw G., Prinsen E. *et al.* 1995. Molecular and physiological responses to abscisic acid and salts in roots of salt-sensitive and salt-tolerant indica rice varieties. *Plant Physiol.* 107: 177–186.
- Moore G.A. 2001. Oranges and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers. *Trends in Genetics.* 17(9): 536-540.
- Moore G.A. et Castle W.S. 1988. Morphological and isozymic analysis of open-pollinated Citrus rootstock populations. *Journal of Heredity.* 79: 59–63.
- Moore G.A., Jacono C.C., Neidigh J.L. *et al.* 1992. *Agrobacterium*-mediated transformation of Citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports.* 11: 238–242.
- Moore G.A., Luth D., McCaffery M., Febres V.J. *et al.* 2000. *Agrobacterium*- mediated transformation of grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) with genes from citrus tristeza virus. *Acta Hort.* 535:237-244.
- Moragues M., Comadran J., Waugh R. *et al.* 2010. Effects of ascertainment bias and marker number on estimations of barley diversity from high-throughput SNP genotype data. *Theor. Appl. Genet.* 120:1525–1534.
- Mouhaya W. 2008. Caractérisation physiologique et moléculaire de la tolérance au stress salin chez les portes-greffe tétraploïdes d'agrumes. Thèse de Doctorat, Université de Corse Pascal Paoli, Corte. 202p.
- Mouhaya W., Allario T., Brumos J., Andrés F., Froelicher Y., Luro F., Talon M., Ollitrault P. et Morillon R. 2010. Sensitivity to high salinity in tetraploid citrus seedlings increases with water availability and correlates with expression of candidate genes. *Functional Plant Biology.* 37: 674–685.
- Mouloud M.A.H., Bousrhal A. *et al.* 2002. Effet du stress salin sur l'accumulation de la proline et des sucres solubles dans les feuilles de trois porte-greffes d'agrumes au Maroc. *Fruits.* 57: 335-340.
- Mourão Filho F., Pio R. *et al.* 2008. Evaluation of citrus somatic hybrids for tolerance to *Phytophthora nicotianae* and citrus tristeza virus. *Sci. Hortic.* 115: 301-308.
- Moya J.L., Primo-Millo E. & Talon M. 1999. Morphological factors determining salt tolerance in citrus seedlings: the shoot to root ratio modulates passive root uptake of chloride ions and their accumulation in leaves. *Plant, Cell & Environment.* 22: 1425–1433.
- Moya J.L., Tadeo F.R., Gomez-Cadenas A. *et al.* 2002. Transmissible salt tolerance traits identified through reciprocal grafts between sensitive Carrizo and tolerant Cleopatra citrus genotypes. *Journal of Plant Physiology.* 159: 991–998.
- Moya J.L., Gomez-Cadenas A., Primo-Millo E. & Talon M. 2003. Chloride absorption in salt-sensitive Carrizo citrange and salt tolerant Cleopatra mandarin citrus rootstocks is linked to water use. *Journal of Experimental Botany.* 54: 825–833.
- Mullan D.J., Colmer T.D., Francki M.G. 2007. *Arabidopsis*-rice–wheat gene orthologues for Na⁺ transport and transcript analysis in wheat–*L. elongatum* aneuploids under salt stress. *Mol. Genet. Genomics.* 277: 199–212.
- Mumford P.M. and Grout B.W.W. 1979. Desiccation and low temperature (–196°C) tolerance of Citrus limon seed. *Seed Science and Technology.* 7: 407–410.
- Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. (Special issue: Drought stress). *Plant, Cell and Environment.* 25: 239-250.
- Munns R. 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist.* 167: 645-663.
- Munns R. et Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 651-681.
- Munns R. et James R.A. 2003. Screening methods for salinity tolerance: a case study with tetraploid wheat. *Plant Soil.* 253: 201–18.
- Munns R., Gardner P.A., Tonnet M.L., Rawson H.M. 1988. Growth and development in NaCl-Treated plants. II. Do Na⁺ or Cl⁻ concentrations in dividing or expanding tissues determine growth in barley? *Functional Plant Biology.* 15(4): 529-540.

- Munns R., Guo J., Passioura J.B., Cramer G.R. 2000. Leaf water status controls day-time but not daily rates of leaf expansion in salt-treated barley. *Aust. J. Plant Physiology*. 27:949-57.
- Munns R., Hussain S., Rivelli A.R. *et al.* 2002. Avenue for increasing salt tolerance of crops, and the role of physiologically based selection traits. *Plant Soil*. 247:93-105.
- Murguía J.R., Belles J.M. & Serrano R. 1995. A salt-sensitive 3'(2'), 5'-bisphosphate nucleotidase involved in sulfate activation. *Science*. 267: 232-234.
- Murguía J.R., Belles J.M. & Serrano R. 1996. The yeast *HAL2* nucleotidase is an in vivo target of salt toxicity. *Journal of Biological Chemistry*. 271: 29029–29033.
- Mutegi E., Sagnard F. *et al.* 2011. Genetic structure and relationships within and between cultivated and wild sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) in Kenya as revealed by microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 122:989–1004. DOI 10.1007/s00122-010-1504-5.
- Mzali M.T. et Lasram M. 2006. L'arboriculture fruitière en Tunisie. Volume 3. Les arbres à pépins, les agrumes et la vigne de table, 183p.
- Nakano M., Nesumi H., Yoshioka T., Omura M. and Yoshida T. 2000. Linkage analysis between male sterility of citrus and RAPD markers. In: *Proceedings of the Ninth International Citrus Congress*. International Society of Citriculture, Orlando, Florida. pp. 179-180.
- Nakano M., Nesumi H., Yoshioka T. et Yoshida T. 2001. Segregation of plants with undeveloped anthers among hybrids derived from the seed parent, 'Kiyomi'. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 70: 539–545.
- Nanjo T., Kobayashi T.M. *et al.* 1999. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 461: 205-210.
- Naot D., Ben-Hayyim G., Eshdat Y. and Holland D. 1995. Drought, heat and salt stress induce the expression of a citrus homologue of an atypical late-embryogenesis *Lea5* gene. *Plant Molecular Biology*. 27: 619-622.
- Naumova T. 1993. *Apomixis in Angiosperms: Nucellar and Integumentary Embryony*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Navarro L., Juárez J., Aleza P. and Pina J.A. 2003. Recovery of triploid seedless mandarin hybrids from 2n x 2n and 2n x 4n crosses by embryo rescue and flow cytometry, pp.541-544. In: I.K. Vasil (ed.), *Plant Biotechnology 2002 and Beyond*, Kluwer Acad. Pu., Dordrecht.
- Navarro L., Olivares Fuster O., Juarez J., Aleza P. *et al.* 2004. Applications of biotechnology to citrus improvement in Spain. *Acta Hort.* 632: 221–234.
- Navarro J.M., Perez-Perez J.G., Romero P., Botia P. 2010. Analysis of the changes in quality in mandarin fruit, produced by deficit irrigation treatments. *Food chemistry*. 119(4): 1591-1596.
- Nesumi H., Nakano M., Yoshioka T., Omura M. et Yoshida T. 2000. Genetic analysis of female sterility from Satsuma. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 69: 192.
- Negi J., Matsuda O. *et al.* 2008. CO2 regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature*. 452: 483–486.
- Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 70: 3321-3323.
- Nei M. 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet.* 41: 225-233.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 89: 583-590.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia Univ. Press, New York.

- Nei M. et Li W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 5269–5273.
- Nei M. et Tajima F. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*. 97: 145-163.
- Nei M. et Chesser R.K. 1983. Estimation of fixation indices and gene diversities. *Ann. Hum. Genet.* 47: 253-259.
- Nei M. et Miller J.C. 1990. A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data. *Genetics*. 125: 873-879.
- Nesumi H., Nakano M., Yoshioka T. 2001. Mode of inheritance on the abnormal development of impregnated ovules derived from Mukaku-kishu. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 70: 403.
- Nicolosi E. 2007. Origin and taxonomy. In: I.A. Khan (ed.). *Citrus genetics, breeding and biotechnology*. CAB International, Wallingford, pp. 19–44.
- Nicolosi E., Deng Z.N., Gentile A., La Malfa S., Continella G. and Tribulato E. 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1155-1166.
- Nicotra A. 2001. Hybrides de type mandarine présentant un intérêt récent pour la consommation à l'état frais. Problèmes et moyens de contrôle. Actes du Symposium sur les Agrumes Chine/Fao, FAO, Beijing (China).
- Nito N., Akihama T. 1990. Prospect of *Citrus* and related genera for disease resistant rootstock. In: *Asia Pacific International Conference on Citriculture*. Chiang Mai, Thailand, FAO-UNDP: 39-47.
- Noble C. et Rogers M. 1992. Arguments for the use of physiological criteria for improving the salt tolerance in crops. *Plant and soil*. 146: 99-107.
- Novaes E., Drost D.R. *et al.* 2008. High-throughput gene and SNP discovery in *Eucalyptus grandis*, an uncharacterized genome. *BMC Genomics*. 9: 312. doi:10.1186/1471-2164-9-312.
- Novelli V.M., Takita M.A., Machado M.A. 2004. Identification and analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in Citrus. *Euphytica*. 138: 227–237.
- Novelli V.M., Cristofani M., Souza A.A. and Machado M.A. 2006. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Genetics and Molecular Biology*. 29(1): 90-96.
- Nuccio M.L., Rhodes D. *et al.* 1999. Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 128-134.
- Nybom H. 2007. Unique reproduction in dogroses (*Ros* sect. *Canina*) maintains successful and highly heterozygous genotypes. In *Apomixis: evolution, mechanisms and perspectives*. Edited by: HÖrandl E, Grossniklaus U, Van Dijk PJ, Sharbel TF. Koenigstein, Germany: Regnum Vegetabile. pp.281-298.
- Ogbonnaya F.C., Huang S., Steadman E. *et al.* 2008. Mapping quantitative trait loci associated with salinity tolerance in synthetic derived backcrossed bread lines. In: Appels R., Eastwood R., Lagudah E., Langridge P., Mackay M., McIntyre L., Sharp P. (eds.). *Proceedings of 11th international wheat genetics symposium*. Sydney University Press, Australia.
- Oh D. H., Lee S.Y., *et al.* 2010. Intracellular consequences of SOS1 deficiency during salt stress. *Journal of Experimental Botany*. 61: 1205-1213.
- Ohnishi Y., Tanaka T. *et al.* 2001. A high-throughput SNP typing system for genome-wide association studies. *J. Hum. Genet.* 46: 471–477.
- Olías R., Eljakaoui Z., Li J. *et al.* 2009. The plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 is essential for salt tolerance in tomato and affects the partitioning of Na⁺ between plant organs. *Plant, Cell & Environment*. 32: 904–916.

- Oliveira A.C., Bastianel M. *et al.* 2007. Development of genetic maps of the citrus varieties ‘Murcott’ tangor and ‘Pera’ sweet orange by using fluorescent AFLP markers. *J. Appl. Genet.* 48: 219–231.
- Ollitrault P. et Faure X. 1992. Système de reproduction et organisation de la diversité génétique dans le genre *Citrus*. In: Complexes d'espèces, flux de gènes et ressources génétiques des plantes. Paris: BRG, pp. 133-51.
- Ollitrault P. et Luro F. 1995. Amélioration des agrumes et biotechnologie. *Fruits*. 50: 267-279.
- Ollitrault P. et Navarro L. 2012. *Citrus*. In: Badenes M.L., Byrne D.H. (eds.) *Fruit breeding*. New-York, USA: Springer. *Handbook of Plant Breeding*. 8: 623-662. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-0763-9_16
- Ollitrault P., Faure X., Normand F. 1992. Citrus rootstocks characterization with bark and leaf isozymes: application for distinguishing nucellar from zygotic trees. In: VIIth International Citrus Congress, pp. 338-341.
- Ollitrault P., Dambier D., Cabasson C., Allent V., Engelmann F. 1994. Optimized management of *Citrus* embryogenic calli for breeding programmes. *Fruits*. 49: 394-7.
- Ollitrault P., Dambier D., Froelicher Y., Bakry F., Aubert B. 1998. Rootstock breeding strategies for the Mediterranean *Citrus* industry ; the somatic hybridization potential. *Fruits*. 53: 335-44.
- Ollitrault P., Jacquemond C., Dubois C., Luro F. 1999. *Citrus*. In: *Genetic diversity of cultivated tropical plants*. Edited by Hamon P., Seguin M., Perrier X., Glaszmann J.C. Enfield, Science Publishers. Montpellier, pp. 89-111.
- Ollitrault P., Dominique D., Froelicher Y. *et al.* 2000a. Apport de l'hybridation somatique pour l'exploitation des ressources génétiques des agrumes. *Cahiers Agricultures*. 9(3): 223-36.
- Ollitrault P., Dambier D., Seker M. and Froelicher Y. 2000b. Rootstock breeding by somatic hybridisation for the mediterranean citrus industry. *Acta Hort.* 535: 157-162.
- Ollitrault P., Jacquemond C., Dubois C., Luro F. 2003. *Citrus*. In: Hamon P., Seguin M., Perrier X. and Glaszmann J.-C. (eds.). *Genetic diversity of cultivated tropical plants*. Montpellier: CIRAD/Science Publishers, Inc., pp. 193-217.
- Ollitrault P., Luro F. et Yamamoto M. 2007a. Seedlessness and ploidy manipulations. In: Khan IA. (ed.) *Citrus genetics, breeding, and biotechnology*. Wallingford, UK: CAB International. pp. 197-218.
- Ollitrault P., Guo W. et Grosser J.W. 2007b. Somatic hybridization. In: Khan IA. (ed.) *Citrus genetics, breeding, and biotechnology*. Wallingford, UK: CAB International. pp. 235-260.
- Ollitrault P., Dambier D., Luro F., Froelicher Y. 2008. Ploidy manipulation for breeding seedless triploid citrus. *Plant Breeding Reviews*. 20: 323–354.
- Ollitrault F., Terol J., Pina J.A., Navarro L., Talon M. and Ollitrault P. 2010. Development of SSR markers from *Citrus clementina* (Rutaceae) BAC end sequences and interspecific transferability in *Citrus*. *American Journal of Botany*. 97(11): 124 -129.
- Ollitrault P., Terol J., Garcia-Lor A., *et al.* 2012a. SNP mining in *C. clementina* BAC end sequences; transferability in the *Citrus* genus (Rutaceae), phylogenetic inferences and perspectives for genetic mapping. *BMC Genomics*. 13:13. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-13-13>.
- Ollitrault F., Terol J., Alonso Martin A. *et al.* 2012b. Development of InDel markers from *Citrus clementina* (Rutaceae) BAC-end sequences and interspecific transferability in *Citrus*. *American Journal of Botany*. 99: 268-273.
- Omar A.A., Song W.Y., Grosser J.W. 2007. Introduction of *Xa21*, a *Xanthomonas*-resistance gene from rice, into ‘Hamlin’ sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] using protoplast-GFP co-transformation or single plasmid transformation. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 82: 914–23.

- Omura M., Ueda T., Kita M. *et al.* 2000. EST mapping in *Citrus*. In: Proceeding of the Ninth International Citrus Congress. International Society of Citriculture (ISC), Orlando, Florida, pp. 71-74.
- Omura M., Ikeda J.K., Nakano M., Fujii H., Shimada T. *et al.* 2008. SNPs analysis and 384-array design for high throughput mapping and genotyping of Citrus. Plant & Animal Genome XVI conference (P441), January 12-16, 2008, San Diego, CA.
- Orbović V., Čalović M. *et al.* 2008. Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry. *Euphytica*. 161:329–335.
- Orbović V., Soria P. *et al.* 2011. The use of citrus tristeza virus (CTV) containing a green fluorescent protein gene as a tool to evaluate resistance/tolerance of transgenic citrus plants. *Crop Protection*. 30: 572-576.
- Ortiz J.M. 2002. Botany: taxonomy, morphology and physiology of fruits, leaves and flowers. In Dugo G. et Di Giacomo A. (eds.). *Citrus. The Genus Citrus*. Taylor and Francis Group, London, pp. 16-35.
- Orzepowski W. et Pulikowski K. 2008. Magnesium, calcium, potassium and sodium content in groundwater and surface water in arable lands in the commune (Gmina) of Katy Wrocławskie. *J. Elementol.* 13: 605-614.
- Pachauri R.K. & Reisinger A. 2007. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change IPCC, Geneva, Switzerland. pp. 104.
- Paillot G., Landais E, Savini I. 1999. Les nouvelles responsabilités des scientifiques face aux incertitudes du futur. Cahiers Agricultures. 8(4): 247-54.
- Pang X.M., Hu C.G. and Deng X.X. 2003. Phylogenetic relationships among Citrus and its relatives as revealed by SSR markers. *Acta Genet. Sin.* 30: 81–87.
- Pang X.M., C.G. Hu and Deng X.X. 2007. Phylogenetic relationships within Citrus and its related genera as inferred from AFLP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 54: 429–436. DOI 10.1007/s10722-006-0005-5
- Pardo J.M., Cubero B., Leidi E.O., Quintero F.J. 2006. Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *J. Exp. Bot.* 57:1181–99.
- Parida S.K., Kalia S.K. *et al.* 2009. Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. *Theor. Appl. Genet.* 118:327–338.
- Parks G.E., Dietrich M.A., Shumaker K.S. 2002. Increased vacuolar Na⁺/K⁺ exchange activity in *Salicornia bigelovii* Torr. in response to NaCl. *Journal of Experimental Botany*. 53: 1055–1065.
- Passioura J.B. et Munns R. 2000. Rapid environmental changes that affect leaf water status induce transient surges or pauses in leaf expansion rate. *Aust. J. Plant Physiol.* 27: 941–48.
- Pavy N., Parsons L., Paule C., MacKay J., Bousquet J. 2006. Automated SNP detection from a large collection of white spruce expressed sequences: contributing factors and approaches for the categorization of SNPs. *BMC Genomics*. 7 : 174. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-7-174>.
- Peña L., Martín-Trillo M. *et al.* 2001. Constitutive expression of *Arabidopsis* *LEAFY* or *APETALA1* genes in *Citrus* reduces their generation time. *Nature Biotechnology*, New York, 19(3): 263-267.
- Peña L., Cervera M., Ghorbel R. *et al.* 2007. Genetic transformation. In: I.A. Khan (ed.). *Citrus genetics, breeding and biotechnology*. CAB International, Wallingford, pp. 329–344.
- Peña L., Cervera M., Fagoaga C. *et al.* 2008. *Citrus*. In: C. Kole and T.C. Hall (eds.), *Compendium of Transgenic Crop Plants*, Vol. 5, Fruits & Nuts (Tropical & Sub-tropical). Wiley-Blackwell.
- Pérez R.M. 1995. Cryoconservation de ressources génétiques d'agrumes. Tèse de doctorat. Université Polytechnique de Valence.

- Pérez R.M., Mas O., Navarro L. and Duran-Vila N. 1999. Production and cryoconservation of embryogenic cultures of mandarin and mandarin hybrids. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 55: 71-74.
- Pérez-Alfocea F., Balibrea M.E. *et al.* 2000. Composition of phloem and xylem exudates in relation to the salt-tolerance of domestic and wild tomato species. *Journal of Plant Physiology*. 156: 367–374.
- Perez-Perez J.G., Castillo I.P., Garcia-Lidon A. *et al.* 2005. Fino lemon clones compared with the lemon varieties Eureka and Lisbon on two rootstocks in Murcia (Spain). *Scientia Horticulturae*. 106: 530–538.
- Pernes J., Lourd M. 1984. Organisation des complexes d'espèces. In: *Gestion des ressources génétiques des plantes*. Paris: Agence de coopération culturelle et technique, 7-108.
- Perrier X. and Jacquemoud-Collet J.P. 2006. DARwin software <http://darwin.cirad.fr/darwin>.
- Perrier X., Flori A., Bonnot F. 1999. Les méthodes d'analyse des données. In: *Diversité génétique des plantes tropicales cultivées*. Hamon P., Seguin M., Perrier X., Glaszmann J.C. (eds.), pp.43. Repères ed Cirad, Montpellier, France.
- Perrier X., Flori A., Bonnot F. 2003. Data analysis methods. In: *Genetic diversity of cultivated tropical plants*. Hamon P., Seguin M., Perrier X., Glaszmann J.C. (eds.), Enfield, Science Publishers. Montpellier. pp 43 - 76.
- Pio R., MourãoFilho F. *et al.* 2006. Propagation of citrus somatic hybrids with potential for utilization as rootstocks. *Fruits*. 61: 1-7.
- Piqueras A., Hernandez J.A. *et al.* 1996. Changes in antioxidant enzymes and organic solutes associated with adaptation of citrus cells to salt stress. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 45: 53-60.
- Posada D. et Crandall K.A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 14: 817 – 818.
- Prasad K.V.S.K., Sharmila P. *et al.* 2000. Transformation of *Brassica Juncea* (L.) Czern with bacterial *codA* gene enhances its tolerance to salt stress. *Molecular Breed.* 6: 489-499.
- Purvis A. C., Yelenosky G. 1983. Translocation of carbohydrates and proline in young grapefruit trees at low-temperatures. *Plant Physiology*. 73: 877-880.
- Qi Z. et Spalding E. P. 2004. Protection of plasma membrane K⁺ transport by the salt overly sensitive1 Na⁺-H⁺ antiporter during salinity stress. *Plant Physiology*. 136: 2548- 2555.
- Qiu Q.S., Guo Y. *et al.* 2002. Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺ /H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 8436–41.
- Qiu Q. S., Guo Y., Quintero F. J. *et al.* 2004. Regulation of vacuolar Na⁺/H⁺ exchange in *Arabidopsis thaliana* by the salt-overly-sensitive (SOS) pathway. *J. Biol. Chem.* 279: 207-215.
- Quang N., Ikeda S., Harada K. 2008. Nucleotide variation in *Quercus crispula* Blume. *Heredity*. 101: 166 – 174.
- Quarrie S.A., Steed A., Calestani C. *et al.* 2005. A high-density genetic map of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) from the cross Chinese Spring X SQ1 and its use to compare QTLs for grain yield across a range of environments. *Theor. Appl. Genet.* 110: 865–880.
- Quesada V., Garcia-Martinez S., Piqueras P. *et al.* 2002. Genetic architecture of NaCl tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 130: 951-963.
- Quintero F.J., Ohta M., Shi H.Z., Zhu J-K., Pardo J.M. 2002. Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na⁺ homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 9061–66.
- Quintero F.J., Martinez-Atienza J. *et al.* 2011. Activation of the plasma membrane Na/H antiporter Salt-Overly-Sensitive 1 (SOS1) by phosphorylation of an auto-inhibitory C-terminal domain. *PNAS*. 108(6): 2611–2616.
- Radyukina N. L., Kartashov A.V. *et al.* 2007. Functioning of defense systems in halophytes and glycophytes under progressing salinity. *Russian Journal of Plant Physiology*. 54: 806-815.

- Rafalski A. 2002. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:94.
- Rai M. 2006. Refinement of the Citrus tristeza virus resistance gene (*Ctv*) positional map in *Poncirus trifoliata* and generation of transgenic grapefruit (*Citrus paradisi*) plant lines with candidate resistance genes in this region. *Plant Molecular Biology*. 61: 399–414.
- Rajaskaran L.R., Aspinal D. & Paleg L.G. 2000. Physiological mechanism of tolerance of *Lycopersicon* spp. Exposed to salt stress. *Canad. J. plant Sci.* 80(1): 151-152.
- Rajendran K., Tester M., Stuart J.R. 2009. Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals. *Plant Cell Environ.* 32: 237–249.
- Ramin A-A. & Alirezanezhad A. 2005. Effects of citrus rootstocks on fruit yield and quality of Ruby Red and Marsh grapefruit. *Fruits*. 60 (05): 311-317.
- Rao N.K. 2004. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology*. 3(2): 136-145.
- Rao M.N., Soneji J.R., Chen C.X., Huang S., Gmitter F.G. 2008. Characterization of zygotic and nucellar seedlings from sour orange-like citrus rootstock candidates using RAPD and EST-SSR markers. *Tree Genet. Genomes*. 4: 113-124.
- Ravel C. Praud S. *et al.* 2007. DNA sequence polymorphisms and their application to bread wheat quality. *Euphytica*. 158:331–336.
- Reuther W. 1977. Genetic resources conservation of citrus species and near relatives from the international viewpoint. *Proceedings of the International Society of Citriculture*. 2: 604–606.
- Rhodes D., Nadolska-Orczyk A., Rich P.J. 2002. Salinity, osmolytes and compatible solutes. In *Salinity: Environment-Plants-Molecules*, Läuchli A., Lüttge U. (eds.), pp.181–204. Dordrecht, Netherlands: Kluwer.
- Ried J.L., Walker-Simmons M.K. 1993. Group 3 late embryogenesis abundant proteins in desiccation-tolerant seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol.* 102: 125–131.
- Riju A., Chandrasekar A., Arunachalam V. 2007. Mining for single nucleotide polymorphisms and insertions/deletions in expressed sequence tag libraries of oil palm. *Bioinformation*. 2: 128 – 131.
- Risso J.A. 1813. *Essai sur l’Histoire Naturelle des Orangers, Bigaradies, Limettiers, Cedratiers, Limoniers ou Citronniers, Cultivés dans le Département des Alpes Maritimes*. Dufour, Paris.
- Risso J.A. et Poiteau A. 1818. *Histoire Naturelle des Orangers*. Herissant de Doux, Paris.
- Risso J.A. *et al.* 2000. *Histoire naturelle des orangers*. Editions Paris: Connaissance et Mémoires.
- Risterucci A.M., Grivet L., N’Goran J.A.K., Pieretti I., Flament M.H., Lanaud C. 2000. A high density linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theor. Appl. Genet.* 101(5-6): 948-955. doi:10.1007/s001220051566.
- Ritter M., Ravasio A. *et al.* 2003. Cell swelling stimulates cytosol to membrane transposition of ICln. *Journal of Biological Chemistry*. 278: 50163–50174.
- Rivandi A. 2009. Toward map-based cloning of a Na⁺ exclusion gene from barley (*Hordeum vulgare* L.). PhD thesis, The University of Adelaide, Australia.
- Roberts S.K. 2006. Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots. *New Phytol.* 169: 647–666.
- Rocha-Pena M.A., Lee R.F., Lastra R., Niblett C.L., Ochoa Corona C.F., Garnsey S.M. and Yokomi R.K. 1995. Citrus trizteza virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*. Threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. *Plant Disease* 79: 437–445.

- Rochdi A., El Yacoubi H. et Rachidai A. 2003. Comportement vis-à-vis de la salinité de cals de porte-greffes d'agrumes *Citrus aurantium*, *Citrange troyer* et *Poncirus trifoliata*: évaluation de critères certifiant la réponse des agrumes au stress salin. *Agronomie*. 23: 643-649.
- Rochdi A., Lemsellek J., Bousarhal A., Rachidai A. 2005. Évaluation sous serre de la tolérance à la salinité de quelques porte-greffes d'agrumes: *Citrus aurantium* et deux hybrides de *Poncirus trifoliata* (*Poncirus* x *Citrus sinensis* et *Poncirus* x Mandarinier *sunki*). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 9 (1): 65-73.
- Rodríguez-Gamir J., Primo-Millo E. *et al.* 2010. Citrus rootstock responses to water stress. *Scientia Horticulturae*. 126: 95-102.
- Romero-Aranda R., Moya J.L., Tadeo F.R. *et al.* 1998. Physiological and anatomical disturbances induced by chloride salts in sensitive and tolerant citrus: beneficial and detrimental effects of cations. *Plant Cell Environ.* 21: 1243-1253.
- Roose M.L. 2000. Linkage mapping and marker-assisted selection in *Citrus*. *Proceedings of the international Society of Citriculture*. IX Congress, Florida, USA, pp. 69-70.
- Roose M.L., Soost R.K., Cameron J.W. 1995. *Citrus*. In: Smart J., Simmonds N.W. (eds.). *The evolution of crop plants*. 2nd edn, Longman, Essex, pp. 443-449.
- Roose M.L., Federici C.T., Mu L., Kwok K., Vu C. 2009. Map-based ancestry of sweet orange and other citrus variety groups. In: Gentile A., Tribulato E. (eds.) *Second International Citrus Biotechnology Symposium*, 28.Tremestieri Etneo, Italy: Emme Erre Grafica.
- Rouse R.E. 1988. Major citrus cultivars of the world as reported from selected countries. *HortScience*. 23: 680-684.
- Rozen S. et Skaletsky H.J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S., Misener S. (eds.). *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Totowa, NJ: Humana Press, pp.365 – 386.
- Ruellan A., Blanchart E., Brauman A. *et al.* 2008. Les sols, des milieux vivants très fragiles. *Dossiers Sud en ligne de l'IRD*. <http://www.ird.fr>
- Ruiz C., Paz Breto M. & Asíns M.J. 2000. A quick methodology to identify sexual seedlings in citrus breeding programs using SSR markers. *Euphytica*. 112: 89-94.
- Ruiz-Rojas J.J., Sargent D.J. *et al.* 2010. SNP discovery and genetic mapping of T-DNA insertional mutants in *Fragaria vesca* L. *Theor. Appl. Genet.* 121: 449-463.
- Rus A., Yokoi S. *et al.* 2001. AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 14150.
- Rus A, Lee B., *et al.* 2004. AtHKT1 facilitates Na⁺ homeostasis and K⁺ nutrition in planta. *Plant Physiology*. 136: 2500.
- Sachidanandam R., Weissman D., Schmidt S.C. *et al.* 2001. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 409: 928 – 933.
- Sahin-çevik M. et Moore G.A. 2006. Identification and expression analysis of cold-regulated genes from the cold-hardy *Citrus* relative *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Plant Mol. Biol.* 62:83-97.
- Saitou N. and Nei M. 1987. The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4(4): 406-425.
- Sakamoto A. et Murata N. 2002. The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant Cell Environ.* 25(2): 163-171.
- Saleh B., Allario T., Dambier D., Ollitrault P., Morillon R. 2008. Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid. *C. R. Biologies*. 331: 703-710.

- Sanchez R., Serra F, Tarraga J. *et al.* 2011. Phylemon 2.0: a suite of web-tools for molecular evolution, phylogenetics, phylogenomics and hypotheses testing. *Nucleic Acids Research*. 39: 1–5. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr408>.
- Sankar A.A. et Moore G.A. 2001. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in *Citrus* and extension of the genetic linkage map. *Theor. Appl. Genet.* 102:206-214.
- Santoni S., Faivre-Rampant P. *et al.* 2000. Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes. *Cahiers/Agricultures*. 9(4): 311-27.
- Sardos J., McKey D., Duval M.F., Malapa R. *et al.* 2008. Evolution of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) after recent introduction into a South Pacific Island system: the contribution of sex to the diversification of a clonally propagated crop. *Genome*. 51: 912–921. doi:10.1139/G08-080.
- Saubry A. J. 1992. Les agrumes en Méditerranée: problématique et perspectives. Options Méditerranéennes, Sér. A/ n°19, 1992- les fruits et légumes dans les économies méditerranéennes Montpellier [France] : CIHEAM-IAMM, pp. 193-199.
- Savidan Y. 2000. Apomixis: Genetics and Breeding. *Pl. Breed. Rev.* 18: 13-86.
- Scarano M.T., Abbate L. *et al.* 2002. ISSR-PCR technique: a useful method for characterizing new allotetraploid somatic hybrids of mandarin, *Plant Cell Rep.* 20:1162-1166.
- Scarano M.T., Tusa N. *et al.* 2003. Flow cytometry, SSR and modified AFLP markers for the identification of zygotic plantlets in backcrosses between 'Femminello' lemon cybrids (2n and 4n) and a diploid clone of 'Femminello' lemon (*Citrus limon* L. Burm. F.) tolerant to *mal secco* disease. *Plant Science*. 164:1009-1017.
- Scarcelli N. 2005. Structure et dynamique de la diversité d'une plante cultivée à multiplication végétative: le cas des ignames au Bénin (*Dioscorea* sp.). PhD thesis Montpellier II University, France.
- Schachtman D.P. et Schroeder J.I. 1994. Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature*. 370: 655–658.
- Schachtman D. et Liu W. 1999. Molecular pieces to the puzzle of the interaction between potassium and sodium uptake in plants. *Trends Plant Sci.* 4: 281–287.
- Schmid K.J., Sørensen T.R. *et al.* 2003. Large-scale identification and analysis of genome-wide single-nucleotide polymorphisms for mapping in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res.* 13: 1250–1257.
- Scora R.W. 1975. On the history and origin of Citrus. In: Symposium on the biochemical systematics, genetic and origin of cultivated plants. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. 102: 369-375.
- Scora R.W. 1988. Biochemistry taxonomy and evolution of modern cultivated citrus. In: VIth International Citrus Congress, pp. 277-289.
- Shaheen T. *et al.* 2010. Detection of single nucleotide polymorphisms in the conserved ESTs regions of *Gossypium arboreum*. *Electronic Journal of Biotechnology*. Doi: 10.2225/vol13-issue5-fulltext-3.
- Shahsavari A.R., Izadpanah K. *et al.* 2007. Characterization of citrus germplasm including unknown variants by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Scientia Horticulturae*. 112: 310–314.
- Sharma R.K., Bhardwaj P. *et al.* 2009. Identification, characterization and utilization of unigene derived microsatellite markers in tea (*Camellia sinensis* L.). *BMC Plant Biology*. 9(53): 1-24. doi:10.1186/1471-2229-9-53.
- Shavruk Y., Gupta N.K. *et al.* 2010. HvNax3-a locus controlling shoot sodium exclusion derived from wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*). *Funct. Integr. Genomics*. doi:10.1007/s10142-009-0153-8.
- Shen B., Jensen R.G., Bohnert H.J. 1997. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiol.* 113: 1177-1183.

- Sheveleva E., Chmara W. *et al.* 1997. Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiol.* 115: 1211-1219.
- Shi H. et Zhu J.-K. 2002. Regulation of expression of the vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene AtNHX1 by salt stress and ABA. *Plant Mol. Biol.* 50: 543-550.
- Shi H., Ishitani M., Kim C. et Zhu J.K. 2000. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na^+/H^+ antiporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 6896–6901.
- Shi H., Quintero F.J., Pardo J.M. and Zhu J.K. 2002. The putative plasma membrane $\text{Na}^{(+)}/\text{H}^{(+)}$ antiporter SOS1 controls long distance $\text{Na}^{(+)}$ transport in plants. *Plant Cell.* 14: 465–477.
- Shi H., Lee B.H., Wu S.J. and Zhu J.K. 2003. Overexpression of a plasma membrane Na^+/H^+ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotechnol.* 21: 81–85.
- Shi A., Chen P. *et al.* 2011. Multiplex single nucleotide polymorphism (SNP) assay for detection of soybean mosaic virus resistance genes in soybean. *Theor. Appl. Genet.* 122: 445–457.
- Shigeoka S., Ishikawa T. *et al.* 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J. Exp. Bot.* 53: 1305–1319.
- Shulaev V., Cortes D., Miller G., Mittler R. 2008. Metabolomics for plant stress response. *Physiol. Plant.* 132: 199–208.
- SID. 2009. Système d'informations sur la désertification en Tunisie. Le profil environnemental de la Tunisie. Ministère de l'environnement et du développement durable. www.environnement.nat.tn
- Silva C., Garcia-Mas J., Sánchez A.M. *et al.* 2005. Looking into flowering time in almond (*Prunus dulcis* (Mill) D. A. Webb): the candidate gene approach. *Theor. Appl. Genet.* 110: 959–968.
- Singh A., Saini M.L., Behl R.K. 2004. Seed germination and seedling growth of citrus (*Citrus* species) rootstocks under different salinity regimes. *Indian J. Agric. Sci.* 74: 246-248.
- Sivamani E., Bahieldin A. *et al.* 2000. Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley *HVA1* gene. *Plant Sci.* 155: 1-9.
- Skerrett M. et Tyerman S.D. 1994. A channel that allows inwardly directed fluxes of anions in protoplasts derived from wheat roots. *Planta.* 192: 295–305.
- Snoussi H., Duval M.F., Garcia-Lor A., Belfalah Z., Froelicher Y., Risterucci A.M., Perrier X., Jacquemoud-Collet J.P., Navarro L., Harrabi M., Ollitrault P. 2012. Assessment of the genetic diversity of the Tunisian citrus rootstock germplasm. *BMC Genet.* 13: 16.
- Soost R.K. 1969. The incompatibility gene system in *Citrus*. *Proc. Ist. Int. Citrus Symposium*, H. Chapman, ed. University of California Riverside. 1: 189-190.
- Soost R.K. 1987. Breeding citrus – genetics and nucellar embryony. In: Abbott A.J. and Atkin R.K. (eds.), *Improving Vegetatively Propagated Crops*. Academic Press, London, pp. 83–110.
- Soost R.K. et Roose M.L. 1996. *Citrus*. In: Janick, J. and Moore, J.N. (eds.). *Fruit Breeding, Vol. I: Trees and Tropical Fruits*. John Wiley and Sons, Inc., pp. 257–323.
- Soost R.K., Williams T.E. and Torres A.M. 1980. Identification of nucellar and zygotic seedlings with leaf isozymes. *HortScience.* 15: 728-729.
- Spiegel-Roy P. et Goldschmidt E. 1996. *Biology of citrus*. Cambridge Univ Press.
- Storey R. et Walker R.R. 1999. Citrus and salinity. *Sci. Hort.* 78: 39–81.
- Stuchi E.S., Donadio L.C. *et al.* 2002. Evaluation of Marsh seedless grapefruit on ten rootstocks in São Paulo, Brazil. *Fruits.* 57: 267-272.

- Subbarao G.V., Wheeler R.M. *et al.* 2001. Glycine betaine accumulation, ionic and water relations of red-beet at contrasting levels of sodium supply. *J. Plant Physiol.* 158: 767–776.
- Sudhir P. et Murthy S.D.S. 2004. Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica.* 42: 481–486.
- Sunarpi H.T., Motoda J. *et al.* 2005. Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na⁺ unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *Plant J.* 44: 928–38.
- Swingle W.T. 1967. The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: Reuther W. *et al.* eds. The Citrus Industry. University of California Press, California, pp. 190-430.
- Swingle W.T. et Webber H.J. 1898. Hybrids and their utilization in plant breeding. 1897 US Dept. Agr. Yrbk. Agr. pp. 383-420.
- Swingle W.T. et Reece P.C. 1967. The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: Reuther W. *et al.* eds. The citrus industry. Vol. 1. History, world distribution, botany and varieties. Berkeley, Etats-Unis, University of California Press, pp. 190-430.
- Sykes S. R. 1985. Effects of seedling age and size on chloride accumulation by juvenile citrus seedlings treated with sodium-chloride under glasshouse conditions. *Australian Journal of Experimental Agriculture.* 25: 943-953.
- Syvänen A.C. 2005. Toward genome-wide SNP genotyping. *Nature Genetics* 37. Suppl:S5-10.
- Syvetsen J. P., Lee L.S, Grosser J.W. 2000. Limitations on growth and net gas exchange of diploid and tetraploid Citrus rootstock cultivars grown at elevated CO₂. *Journal of the American Society for Horticultural Science.* 125: 228-234.
- Szabolcs I. 1989. Salt-affected soils, Boca Raton FL: CRC Press.
- Tabor H.K., Risch N.J, Myers R.M. 2002. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: Practical considerations. *Nat. Rev. Genet.* 3: 391–397.
- Tadeo F., Cercós M., Colmenero-Flores J., Iglesias D., *et al.* 2008. Molecular physiology of development and quality of citrus. *Advances in Botanical Research.* 47: 147-223.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N. *et al.* 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28(10): 2731–2739. doi:10.1093/molbev/msr121.
- Tan M.L., Song J.K., Deng X.X. 2007. Production of two mandarin X trifoliate orange hybrid populations via embryo rescue with verification by SSR analysis. *Euphytica.* 157:155–160.
- Tan B., Li D.L. *et al.* 2009. Highly efficient transformation of the GFP and MAC12.2 genes into precocious trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* [L.] Raf), a potential model genotype for functional genomics studies in *Citrus*. *Tree Genetics & Genomes.* 5(3): 529-537.
- Tanaka T. 1961. Citrologia: semi centennial commemoration paperson citrus studies. Citrologia supporting fondation, Osaka, Japan 114p.
- Targon M.L.P.N., Machado M.A., Coletta Filho H.D., Cristofani M. 2000. Genetic polymorphism of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) varieties evaluated by random amplified polymorphic DNA. *Acta Hortic.* 535: 51-53.
- Tatum J.H., Berry R.E., Hearn C.I. 1974. Characterization of citrus cultivars and separation by thin layer chromatography. *Proc. of the Florida State Horticultural Society.* 87: 75-81.
- Teakle N. L. et Tyerman S.D. 2010. Mechanisms of Cl⁻ transport contributing to salt tolerance. *Plant Cell Environ.* 33: 566-589.
- Teige M., Scheikl E., Eulgem T. *et al.* 2004. The MKK2 Pathway Mediates Cold and Salt Stress Signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Cell.* Vol. 15: 141–152.

- Tenaillon M.I., Sawkins M.C. *et al.* 2001. Patterns of DNA sequence polymorphism along chromosome 1 of maize (*Zea mays* ssp *mays* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 98: 9161–9166.
- Terol J., Agusti J. *et al.* 2005. Analysis of Citrus ESTs from standard and normalized full length cDNA libraries. *Plant & Animal Genome XIII conference (W068)*, January 15-19, 2005, Town & Country Conservation Center, San Diego, CA.
- Terol J., Conesa A., Colmenero J.M., Cercos M., Tadeo F., Agusti J. *et al.* 2007. Analysis of 13000 unique Citrus clusters associated with fruit quality, production and salinity tolerance. *BMC Genomics*. 8: 31.
- Terol J., Naranjo M.A., Ollitrault P. and Talon M. 2008. Development of genomic resources for *Citrus clementina*: Characterization of three deep-coverage BAC libraries and analysis of 46,000 BAC end sequences. *BMC Genomics*. 9: 423. doi:10.1186/1471-2164-9-423.
- Tester M. et Davenport R.J. 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany*. 91: 503-527.
- Toenniessen G.H. 2001. Feeding the world in the 21st century: Plant breeding, biotechnology, and the potential role of apomixis. In *Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering*, Y. Savidan, J.G. Carman, and T. Dresselhaus, eds (Mexico: CIMMYT, IRD, European Commission DG VI), pp. 1–7.
- Tokunaga T., Nii M., Tsumura T. and Yamao M. 2005. Production of triploids and breeding seedless cultivar 'Tokushima 3X No. 1 from tetraploid × diploid crosses in sudachi (*Citrus sudachi* Shirai). *Horticultural Research Japan*. 4(1): 11–15.
- Tolkowsky S. 1938. *Hesperides: a History of the Culture and Use of Citrus Fruits*. John Bale, Sons and Curnow Ltd, London.
- Torres A.M., Soost R.K., Diedenhofen U. 1978. Leaf isozymes as genetic markers in *Citrus*. *American Journal of Botany*. 65: 869 – 881.
- Tóth G., Gáspári Z., Jurka J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*. 10: 967-981.
- Türkana I. Demiral T. 2009. Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany*. 67: 2–9.
- Tusa N., Fatta Del Bosco S., Nardi L., Lucretti S. 1996. Obtaining triploid plants by crossing *Citrus limon* cv «Feminello» 2nx4n allotetraploid somatic hybrids. In: VIIIth Int. Congress of Citriculture. South Africa: Int Soc Citr. pp. 133-6.
- Tusa N., Loredana A., Sergio F. *et al.* 2002. Identification of zygotic and nucellar seedlings in Citrus interploid crosses by means of isozymes, flow cytometry and ISSR-PCR. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 7: 703-708.
- Tuskan G.A., DiFazio S., Jansson S. *et al.* 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*. 313: 1596 – 1604.
- Ueda A., Kathiresan A., Inada M. *et al.* 2004. Osmotic stress in barley regulates expression of a different set of genes than salt stress does. *J. Exp. Bot.* 55: 2213–2218.
- Ueno I. 1986. Studies on the inheritance of citrus flower characteristics. I. Segregation of viable pollen production in hybrid seedlings. *Bulletin of the Fruit Tree Research Station*. 13: 1-9.
- Ulm R., Ichimura K. *et al.* 2002. Distinct regulation of salinity and genotoxic stress responses by *Arabidopsis* MAP kinase phosphatase 1. *Embo J.* 21: 6483-6493.
- Uozumi N., Kim E.J. *et al.* 2000. The *Arabidopsis* HKT1 gene homolog mediates inward Na⁺ currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiology*. 122: 1249–1259.
- Urao T., Yakubov B. *et al.* 1999. A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell*. 11: 1743-1754.

- USDA-ARS. 2008. Research Databases. Bibliography on salt tolerance. George E. Brown, Jr. Salinity Lab. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service. Riverside. CA. [<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm>].
- Uzun A., Yesiloglu T., Aka-Kacar Y., Tuzcu O., Gulsen O. 2009. Genetic diversity and relationships within *Citrus* and related genera based on sequence related amplified polymorphism markers (SRAPs). *Scientia Horticulturae*. 121: 306 – 312.
- Valderrama R., Corpas F.J. *et al.* 2007. Nitrosative stress in plants. *FEBS Lett.* 581: 453–461.
- Van Dijk P. et Van Damme J. 2000. Apomixis technology and the paradox of sex. *Trends plant Sci.* 5(2): 81-85.
- Van Inghelandt D. *et al.* 2010. Population structure and genetic diversity in a commercial maize breeding program assessed with SSR and SNP markers. *Theor. Appl. Genet.* 120:1289–1299. DOI 10.1007/s00122-009-1256-2.
- Van Tienderen P.H., de Haan A.A. *et al.* 2002. Biodiversity assessment using markers for ecologically important traits. *Trends Ecol. Evol.* 17:577–582.
- Vardi A., Neuman H., Frydman-Shani A., Yaniv Y. and Spiegel-Roy P. 2000. Tentative model on the inheritance of juvenility, self-incompatibility and parthenocarpy. *Acta Horticulturae*. 535: 199-205.
- Vera-Estrella R., Barkla B.J. *et al.* 2005. Salt stress in *Thellungiella halophila* activates Na⁺ transport mechanisms required for salinity tolerance. *Plant Physiol.* 139: 1507–1517.
- Viruel M.A. et Hormaza J.I. 2004. Development, characterization and variability analysis of microsatellites in lychee (*Litchi chinensis* Sonn., Sapindaceae). *Theor. Appl. Genet.* 108(5): 896-902, DOI: 10.1007/s00122-003-1497-4.
- Wakana S., Iwamasa M. and Uemoto S. 1981. Seed development in relation to ploidy of zygotic embryo and endosperm in polyembryonic citrus. In: *Proceedings of the Fourth International Citrus Congress*. International Society of Citriculture, Tokyo, Japan, Vol. 1, pp. 35-39.
- Wang Y., Li J., Xia R.X. 2010. Expression of chalcone synthase and chalcone isomerase genes and accumulation of corresponding flavonoids during fruit maturation of Guoqing No.4 satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marcow). *Sci. Hortic.* 125: 110-116.
- Webber H.J. 1967. History and development of the citrus industry. In: *The citrus industry*. 1. Reuther W. *et al.* (eds.), Berkeley, Etats-Unis, University of California Press, pp. 1-39.
- Weil M.M., Pershad R. *et al.* 2004. Use of BAC end sequences for SNP discovery. *Methods Mol. Biol.* 256:1-6.
- Weir B.S. 1990. *Genetic data analysis*. Sinauer, Sunderland, MA.
- Weir B.S. 1996. *Genetic data Analysis II*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass.
- Weir B.S. et Cockerham C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 38: 1358–1370.
- White P.J. & Broadley M.R. 2001. Chloride in soils and its uptake and movement within the plant: a review. *Annals of Botany*. 88: 967–988.
- Winicov I. 1998. New Molecular Approaches to Improving Salt Tolerance in Crop Plants. *Annals of Botany*. 82: 703–710. Article No. bo980731.
- Wright S. 1969. *Evolution and the genetics of populations*. Vol. 2. The theory of gene frequencies. University of Chicago Press, Chicago.
- Wright S. 1978. *Evolution and the Genetics of Populations*, Vol. IV. Variability Within and Among Natural Populations. University of Chicago Press, Chicago.
- Wright S.I. et Gaut B.S. 2005. Molecular population genetics and the search for adaptive evolution in plants. *Mol. Biol. Evol.* 22: 506–519.

- Wu S., Ding L., Zhu J. 1996. SOS1, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *The Plant Cell Online*. 8: 617.
- Wu J.H., Ferguson A.R. & Mooney P.A. 2005. Allotetraploid hybrids produced by protoplast fusion For seedless triploid Citrus breeding. *Euphytica*. 141: 229–235. DOI: 10.1007/s10681-005-7009-7
- Wu C.A., Yang G.D., Q.W. Meng and C.C Zheng. 2004. The Cotton *GhNHX1* Gene Encoding a Novel Putative Tonoplast Na^+/H^+ Antiporter Plays an Important Role in Salt Stress. *Plant Cell Physiol*. 45(5): 600-607. doi: 10.1093/pcp/pch071
- WuY., Ding N., Zhao X. *et al.* 2007. Molecular characterization of *PeSOS1*: the putative Na^+/H^+ antiporter of *Populus euphratica*. *Plant Mol. Biol.* 65: 1–11.
- Wu S-B., Wirthensohn M.G. *et al.* 2008. High resolution melting analysis of almond SNPs derived from ESTs. *Theor. Appl. Genet.* 118: 1–14.
- Xiang C. et Roose M.L. 1988. Frequency and characteristics of nucellar and zygotic seedlings in 12 citrus rootstocks. *Scientia Horticulturae*. 37:47-59.
- Xiong L., Ishitani M., Lee H. and Zhu J.K. 2001. The *Arabidopsis* LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress and osmotic stress responsive gene expression. *Plant Cell*. 13: 2063–2083.
- Xiong L., Schumaker K.S. and Zhu J.K. 2002. Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress. *The Plant Cell*. S165–S183.
- Xu D., Duan X., Wang B., Hong B., Ho T., Wu R. 1996. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol*. 110: 249–257.
- Xu G., Magen H., Tarchitzky J., Kafkafi U. & Donald L.S. 1999. Advances in chloride nutrition of plants. In: *Advances in Agronomy*. Academic Press, San Diego, CA, USA. Vol. 68 (ed. D. Sparks), pp. 96–150.
- Xue Z.Y., Zhi D.Y. *et al.* 2004. Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na^+ . *Plant Sci*. 167: 849–59.
- Xue D., Huang Y., Zhang X. *et al.* 2009. Identification of QTLs associated with salinity tolerance at late growth stage in barley. *Euphytica*. 169: 187–196.
- Xue D., Zhou M. *et al.* 2010. Identification of QTLs for yield and yield components of barley under different growth conditions. *J. Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)*. 11(3): 169-176.
- Yamamoto M., Matsumoto R. and Yamada Y. 1995. Relationship between sterility and seed-lessness in citrus. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 64: 23-29.
- Yamamoto M., Kobayashi S., Nakamura Y., Yamada Y. 1993. Phylogenetic relationships of *Citrus* revealed by diversity of cytoplasmic genomes. In: Hayashi T., Omura M., Scott N.S. (eds.) *Techniques on gene diagnosis and breeding in fruit trees*. Fruit Trees Research Station, Okitsu, pp. 39–46.
- Yamamoto A., Bhuiyan Md.N. H. *et al.* 2005. Suppressed expression of the apoplastic ascorbate oxidase gene increases salt tolerance in tobacco and Arabidopsis plants. *Journal of Experimental Botany*. 56(417): 1785-1796.
- Yamamoto K., Narukawa J., Kadono-Okuda K., *et al.* 2006. Construction of a Single Nucleotide Polymorphism Linkage Map for the Silkworm, *Bombyx mori*, Based on Bacterial Artificial Chromosome End Sequences. *Genetics*. 173: 151-161.

- Yamasaki M., Wright S.I., McMullen M.D. 2005. Genomic Screening for Artificial Selection during Domestication and Improvement in Maize. *Ann. Bot.* 100(5): 967-973. doi: 10.1093/aob/mcm173.
- Yancey P.H., Clark M.E., Hand S.C. *et al.* 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte system. *Science*. 217: 1214-1222.
- Yang Q., Chen Z. Z., Zhou X. F. *et al.* 2009. Overexpression of SOS (Salt Overly Sensitive) genes Increases Salt Tolerance in Transgenic Arabidopsis. *Molecular Plant*. 2(1): 22-31.
- Yang Y., Pan Y., Gong X., Fan M. 2010. Genetic variation in the endangered Rutaceae species *Citrus hongheensis* based on ISSR fingerprinting. *Genet. Resour. Crop Evol.* doi 10.1007/s10722-010-9571-7
- Yao J., Wu J., Gleave A.P. *et al.* 1996. Transformation of citrus embryogenic cells using particle bombardment and production of transgenic embryos. *Plant Science. Clare*. 113(2): 175-183.
- Yeo A.R., Yeo M.E., Flowers S.A., Flowers T.J. 1990. Screening of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes for physiological characters contributing to salinity resistance, and their relationship to overall performance. *Theoretical and Applied Genetics*. 79: 377-384.
- Yokoi S., Bressan R.A. and Hasegawa P.M. 2002. Salt Stress Tolerance of Plants. JIRCAS Working Report. pp. 25-33.
- Yu J.N., Zhang J.S., Shan L., Chen S.Y. 2005. Two new group 3 LEA genes of wheat and their functional analysis in yeast. *J. Integr. Plant Biol.* 47: 1372–1381.
- Zalapa J.E., Price D.L. *et al.* 2011. Hierarchical classification of switchgrass genotypes using SSR and chloroplast sequences: ecotypes, ploidies, gene pools, and cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 122:805–817. DOI 10.1007/s00122-010-1488-1.
- Zane L., Bargelloni L., Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol. Ecol.* 11: 1–16.
- Zekri M. 1993. Salinity and calcium effects on emergence, growth and mineral composition of seedlings of eight citrus rootstocks. *J. Hort. Sci.* 68: 53-62.
- Zekri M. et Parsons L.R. 1989. Growth and root hydraulic conductivity of several citrus rootstocks under salt and polyethylene glycol stresses. *Physiol. Plant.* 77: 99-106.
- Zekri M. et Parsons L.R. 1992. Salinity tolerance of citrus rootstocks: effects of salt on root and leaf mineral concentrations. *Plant and soil*. 147: 171-181.
- Zekri S. et Laajimi A. 2001. Etude de la compétitivité du sous-secteur agrumicole en Tunisie. In Laajimi A. (ed.), Arfa L. (ed.). *Le futur des échanges agro-alimentaires dans le bassin méditerranéen: les enjeux de la mondialisation et les défis de la compétitivité*. Zaragoza: CIHEAM-IAMZ, pp. 9-16.
- Zekri M. et Al-Jaleel A. 2004. Evaluation of rootstocks for Valencia and Navel orange trees in Saudi Arabia. *Fruits*. 59: 91-100.
- Zhano D., Wencai Z. et Shuyuan W. 1993. *In Vitro* Induction and Protoplast Plant Regeneration from NaCl-Tolerant Lines in Citrus [J]. *Acta Horticulturae Sinica*. 02.
- Zhang H.X. et Blumwald E. 2001. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotechnology*. 19: 765-768.
- Zhang L., Vision T.J., Gaut B.S. 2002. Patterns of nucleotide substitution among simultaneously duplicated gene pairs in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology and Evolution*. 19: 1464–1473.
- Zhang J., Flowers T., Wang S. 2010. Mechanisms of sodium uptake by roots of higher plants. *Plant and soil*. 326: 45-60.
- Zhang L., Ohta A. *et al.* 2000. Expression of plant group 2 and group 3 lea genes in *Saccharomyces cerevisiae* revealed functional divergence among LEA proteins. *J. Biochem.* 127:611–616.

- Zhang H.X., Hodson J.N., Williams J.P. and Blumwald E. 2001. Engineering salt-tolerant Brassica plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*. 98:12832–12836.
- Zhang C., Lang P. *et al.* 2005. Cold acclimation down regulated genes in *Poncirus trifoliata*. *Can. J. Plant Sci.* 85: 417–424.
- Zhu J. 2000. Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 124(3): 941–948.
- Zhu J.-K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6(2): 66-71.
- Zhu J.-K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53:247–273.
- Zhu J.-K. 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 441–445.
- Zhu J.-K. 2007. Plant Salt Stress. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd. www.els.net. doi: 10.1002 /9780470015902.a0001300.pub 2
- Zhu Z. et Wu R. 2008. Regeneration of transgenic rice plants using high salt for selection without the need for antibiotics or herbicides. *Plant Sci.* 174: 519–523.
- Zhu Y.L., Song Q.J. *et al.* 2003. Single-nucleotide polymorphisms in soybean. *Genetics*. 163: 1123-1134.
- Zhu C., Gore M. *et al.* 2008. Status and Prospects of Association Mapping in Plants. *The plant genome*. 1(1): 5-20.
- Zwick M.S., Islam-Faridi M.N., Zhang H.B. *et al.* 2000. Distribution and sequence analysis of the centromere-associated repetitive element CEN38 of *Sorghum bicolor* (Poaceae). *American Journal of Botany*. 87(12): 1757–1765.

Annexes

Annexe I- Le germoplasme local Tunisien, représentant les différents groupes variétaux d'agrumes, collecté pour les analyses de diversité (201 accessions)

Numéro d'accession	Nom local de l'accession+infos	Code	Groupe variétal	Nom latin	Origine de l'arbre	Origine
1	Aranj type dominant	SP1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Parc semencier Sbikha- Kairouan
2	Aranj type dominant	SP2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Parc semencier Sbikha- Kairouan
3	Aranj type dominant	SP3	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Parc semencier Sbikha- Kairouan
4	Aranj type dominant	SP4	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Parc semencier Sbikha- Kairouan
5	Aranj type dominant	SP5	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Parc semencier Sbikha- Kairouan
6	Aranj type dominant	SP6	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Parc semencier Sbikha- Kairouan
7	Aranj type dominant	SP7	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Parc semencier Sbikha- Kairouan
8	Aranj type dominant	SP8	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Parc semencier Sbikha- Kairouan
9	Aranj type dominant	SP9	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Parc semencier Sbikha- Kairouan
10	Aranj type dominant	SP10	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Parc semencier Sbikha- Kairouan
11	Aranj type dominant	SP11	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Parc semencier Sbikha- Kairouan
12	Aranj type dominant	SP12	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Parc semencier Sbikha- Kairouan
13	Aranj type dominant	SP13	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Parc semencier Sbikha- Kairouan
14	Aranj type dominant	SP14	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Parc semencier Sbikha- Kairouan
15	Aranj type dominant	SP15	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Parc semencier Sbikha- Kairouan
16	Aranj type dominant	SP16	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Parc semencier Sbikha- Kairouan
17	Aranj type dominant	SP17	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Parc semencier Sbikha- Kairouan
18	Aranj type dominant	SP18	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Parc semencier Sbikha- Kairouan
19	Aranj type dominant	SP19	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Parc semencier Sbikha- Kairouan
20	Aranj type dominant	SP20	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Parc semencier Sbikha- Kairouan
21	Aranj type dominant	SP21	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Parc semencier Sbikha- Kairouan
22	Aranj type dominant	SP22	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Parc semencier Sbikha- Kairouan
23	Aranj type dominant	SP23	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Parc semencier Sbikha- Kairouan
24	Aranj type dominant	SP24	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Parc semencier Sbikha- Kairouan
25	Aranj type dominant	SP25	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Parc semencier Sbikha- Kairouan
26	Aranj type dominant	SP26	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Parc semencier Sbikha- Kairouan
27	Aranj type dominant	SP27	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Parc semencier Sbikha- Kairouan

28	Aranj fdp*	E1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Echrihaat- Cap-Bon
29	Aranj fdp (sol h'méri)	E2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Echrihaat- Cap-Bon
30	Aranj fdp (arbre>70 ans, sol h'méri)	E3	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Echrihaat- Cap-Bon
31	Aranj fdp	E4	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Echrihaat- Cap-Bon
32	Aranj (du Djebel)	BK1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Beni- Khia- Cap-Bon
33	Aranj (du Djebel)	BK2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Beni- Khia- Cap-Bon
34	Aranj fdp (collection INRAT)	G1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	El Gobba- Cap-Bon
35	Aranj fdp (collection INRAT)	G2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	El Gobba- Cap-Bon
36	Aranj fdp (collection INRAT)	G3	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	El Gobba- Cap-Bon
37	Aranj fdp (collection INRAT)	G4	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	El Gobba- Cap-Bon
38	Aranj fdp (collection INRAT)	G5	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	El Gobba- Cap-Bon
39	Aranj fdp (collection INRAT)	G6	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	El Gobba- Cap-Bon
40	Aranj fdp arbre-mère	MBZ1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Menzel bou Zelfa-Cap-Bon
41	Orange Meski “kalb”	MBZ2	Orange douce	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Plant de semis	Menzel bou Zelfa-Cap-Bon
42	Aranj fdp arbre-mère	MBZ3	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Menzel bou Zelfa-Cap-Bon
43	Orange Meski “kalb”	MBZ4	Orange douce	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Plant de semis	Menzel bou Zelfa-Cap-Bon
44	Aranj fdp	MBZ5	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Menzel bou Zelfa-Cap-Bon
45	Aranj à feuilles très longues filiformes	MCB1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Menzel bou Zelfa-Cap-Bon
46	Aranj fdp sélectionné	MCB2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Menzel bou Zelfa-Cap-Bon
47	Aranj fdp	A1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Greffage	El Alia- Bizerte
48	Aranj fdp	AB1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	El Alia- Bizerte
49	Aranj rejet (pg citronnier)	AB2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	El Alia- Bizerte
50	Aranj fdp	AB3	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	El Alia- Bizerte
51	Aranj fdp	GCB1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	El Gobba- Cap-Bon
52	Aranj fdp	GOC1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	El Gobba- Cap-Bon
53	Aranj fdp	GOC2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	El Gobba- Cap-Bon
54	Aranj fdp	AZ1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Inconnue	El Azib- Bizerte
55	Aranj fdp	AZ2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Inconnue	El Azib- Bizerte
56	Aranj fdp (verger ex-colon)	ABZ1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Inconnue	El Azib- Bizerte
57	Aranj fdp (verger ex-colon)	ABZ2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Inconnue	El Azib- Bizerte
58	Aranj fdp	BNk1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Beni- Khia- Cap-Bon
59	Aranj rejet (pg lime)	BNk2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Beni- Khia- Cap-Bon

60	Aranj fdp à fleurs d'oranger ordinaires	BNk3	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Beni- Khia- Cap-Bon
61	Aranj fdp	BKA1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Beni- Khia- Cap-Bon
62	Aranj fdp	YTC1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	El Gobba- Cap-Bon
63	Aranj fdp	YTC2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	El Gobba- Cap-Bon
64	Aranj fdp	YTC3	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	El Gobba- Cap-Bon
65	Aranj fdp	SMS1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Bou Argoub- Cap-Bon
66	Aranj fdp	SMS2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Bou Argoub- Cap-Bon
67	Aranj fdp	SMS3	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Bou Argoub- Cap-Bon
68	Aranj fdp	TS1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Bou Argoub- Cap-Bon
69	Aranj fdp	TS2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Bou Argoub- Cap-Bon
70	Aranj fdp	TS3	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Bou Argoub- Cap-Bon
71	Aranj fdp âgé d'entre 120-150 ans	BA1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Inconnue	Bou Argoub- Cap-Bon
72	Aranj fdp âgé d'entre 120-150 ans	BA2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Inconnue	Bou Argoub- Cap-Bon
73	Aranj fdp âgé d'entre 120-150 ans	BA3	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Inconnue	Bou Argoub- Cap-Bon
74	Aranj fdp	RDJ1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Ras Djebel- Bizerte
75	Aranj fdp	RDJ2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Ras Djebel- Bizerte
76	Aranj fdp "doux"	RDJ3	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Ras Djebel- Bizerte
77	Aranj fdp	KB1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Kaa el Ballout- Bizerte
78	Aranj fdp	KB2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Kaa el Ballout- Bizerte
79	Orange fdp	RB1	Orange douce	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Plant de semis	Raf-Raf- Bizerte
80	Aranj comestible « Chiiri »	RB2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Raf-Raf- Bizerte
81	Aranj fdp	BSJ1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Bou Salem- Jendouba
82	Aranj fdp	FS1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Bou Salem- Jendouba
83	Aranj fdp	INRA1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Greffage	Bou Salem- Jendouba
84	Aranj fdp	ABM1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Mornag
85	Aranj fdp	ABM2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Mornag
86	Aranj fdp (plantule pour greffage)	GIF1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Oued Mliz- Jendouba
87	Aranj fdp (plantule pour greffage)	GIF2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Oued Mliz- Jendouba
88	Aranj fdp (plantule pour greffage)	GIFJ1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Oued Mliz- Jendouba
89	Aranj fdp (plantule pour greffage)	GIFJ2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Oued Mliz- Jendouba
90	Aranj fdp	OTD1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	El Kodia- Jendouba
91	Aranj fdp	OTD2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	El Kodia- Jendouba
92	Aranj fdp	HK1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Inconnue	Haffouz- Kairouan
93	Aranj fdp	HK2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Inconnue	Haffouz- Kairouan

94	Aranj fdp	JK1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Ain Jalloula-Kairouan
95	Aranj fdp	KDS1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Greffage	Sbikha- Kairouan
96	Aranj fdp	KDS2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Greffage	Sbikha- Kairouan
97	Aranj fdp	HJB1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Greffage	Béjà
98	Aranj fdp	LTB1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Thibar- Béjà
99	Aranj "à petits fruits"	LTB2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Thibar- Béjà
100	Aranj fdp	JPT1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Inconnue	Testour- Béjà
101	Aranj fdp	JPT2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Inconnue	Testour- Béjà
102	Aranj fdp	BCV1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Inconnue	Testour- Béjà
103	Aranj fdp	VGB1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Testour- Béjà
104	Aranj fdp	VGB2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Testour- Béjà
105	Aranj fdp	ABMO1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Mornag
106	Aranj fdp	ABMO2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Mornag
107	Aranj fdp	ERR1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Greffage	Mornag
108	Aranj fdp	GIAF1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Mornag
109	Aranj fdp	GIAF2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Mornag
110	Citronnier local "arbi" utilisé comme porte-greffe pour la variété "Maltaise"	OTDCB1	Citron	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	Plant de semis	Menzel bou Zelfa-Cap-Bon
111	Aranj fdp	OTDCB2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Menzel bou Zelfa-Cap-Bon
112	Aranj fdp	OTDCB3	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Menzel bou Zelfa-Cap-Bon
113	Aranj fdp	OTDCB4	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Menzel bou Zelfa-Cap-Bon
114	Aranj "avec fruits aplatis"	OTDCB5	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Menzel bou Zelfa-Cap-Bon
115	Orange Meski "kalb"	LMM1	Orange douce	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Plant de semis	Menzel bou Zelfa-Cap-Bon
116	Orange Meski "kalb"	LMM2	Orange douce	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Plant de semis	Menzel bou Zelfa-Cap-Bon
117	Citronnier local "arbi" utilisé comme porte-greffe pour la variété "Maltaise"	LMM3	Citron	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	Plant de semis	Menzel bou Zelfa-Cap-Bon
118	Aranj fdp (collection)	CSK1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Sbikha- Kairouan
119	Aranj fdp	HMA1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Mides- Tozeur
120	Orange "chroubou"	HMA2	Orange douce	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Plant de semis	Mides- Tozeur
121	Lime "Chiiri"	HMA3	Lime	<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	Marcottage	Mides- Tozeur
122	Lime "Chiiri"	HMA4	Lime	<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	Marcottage	Mides- Tozeur
123	Citronnier ordinaire fdp	MBA1	Citron	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	Marcottage	Mides- Tozeur
124	Aranj fdp	MBA2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Mides- Tozeur
125	Orange sanguine "chroubou"	TT1	Orange douce	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Plant de semis	Tamaghza- Tozeur
126	Orange "Meski"	TT2	Orange douce	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Plant de semis	Tamaghza- Tozeur
127	Lime "Chiiri"	CHD1	Lime	<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	Marcottage	Degache- Tozeur
128	Citronnier fdp très vigoureux	CHD2	Citron	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	Marcottage	Degache- Tozeur

129	Citronnier "Beldi"	CHD3	Lime	<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	Marcottage	Degache- Tozeur
130	Oranger fdp	CHD4	Orange douce	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Plant de semis	Degache- Tozeur
131	Citronnier "avec un apex sous forme de mamelle et des fruits piriformes"	CHD5	Citron	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	Marcottage	Degache- Tozeur
132	Citronnier	MSD1	Citron	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	Marcottage	Degache- Tozeur
133	Aranj fdp	SFG1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Gafsa
134	Aranj fdp arbre-mère	SFG2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Gafsa
135	Aranj fdp	SFG3	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Gafsa
136	Citronnier arbre-mère (lime de Gafsa)	SFG4	Citron	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	Marcottage	Gafsa
137	Lime douce	SFG5	Lime	<i>Citrus limetta</i> Risso	Marcottage	Gafsa
138	Aranj fdp	HZG1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Greffage	El Gsar- Gafsa
139	Aranj fdp	HZG2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Greffage	El Gsar- Gafsa
140	Citronnier "Chiiri"	HZG3	Citron	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	Marcottage	El Gsar- Gafsa
141	Aranj fdp	JSK1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	El Khlidia- Mornag
142	Aranj fdp	JSK2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	El Khlidia- Mornag
143	Aranj fdp	JSK3	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	El Khlidia- Mornag
144	Aranj fdp	SHM1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	El Khlidia- Mornag
145	Aranj "Arbi"	HTH1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Hammamet
146	Aranj "Souri"	HTH2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Hammamet
147	Aranj "Arbi"	HTH3	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Hammamet
148	Aranj "Arbi"	AKH1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Hammamet
149	Aranj "Souri"	AKH2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Hammamet
150	Aranj "Arbi" greffé	HMH1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	El Ghrouss- Hammamet
151	Aranj "Arbi"	HMH2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	El Ghrouss- Hammamet
152	Aranj "Arbi", "baali=non irrigué"	TJH1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Inconnue	Hammamet
153	Aranj fdp	RFH1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Greffage	Hammamet
154	Aranj fdp	EXFD1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Greffage	Hammamet
155	Aranj fdp	EXFD2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Greffage	Hammamet
156	Aranj fdp	CHO1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Ouechtata- Beja
157	Aranj fdp	CHO2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Ouechtata- Beja
158	Aranj fdp	KOUB1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Ouechtata- Beja
159	Aranj fdp	KOUB2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Ouechtata- Beja
160	Aranj fdp	KOUB3	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Ouechtata- Beja
161	Aranj fdp	KOUB4	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Ouechtata- Beja
162	Aranj rejet	KOUB5	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Ouechtata- Beja
163	Aranj fdp	KOUB6	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Ouechtata- Beja
164	Aranj fdp	KOUB7	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Ouechtata- Beja
165	Aranj fdp	BOU1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Ouechtata- Beja
166	Aranj fdp	CCSPS1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Menzel bou Zelfa- Cap-Bon
167	Aranj fdp	CCSPS2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Menzel bou Zelfa- Cap-Bon
168	Aranj fdp	CCSPS3	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Menzel bou Zelfa- Cap-Bon
169	Aranj fdp	MJK1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Greffage	El Khlidia- Mornag
170	Aranj fdp	HBK1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	El Khlidia- Mornag
171	Aranj fdp	HBRK1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	El Khlidia- Mornag
172	Aranj fdp	FGK1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	El Khlidia- Mornag

173	Aranj fdp	SPAM1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	El M'hamdia
174	Citronnier	BZT1	Citron	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	Marcottage	Oasis ancien- Tozeur
175	Lime "Arbi"	MMT1	Lime	<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	Marcottage	Oasis ancien- Tozeur
176	Lime douce	ZAD1	Lime	<i>Citrus limetta</i> Risso	Marcottage	Degache- Tozeur
177	Orange "Meski"	ZAD2	Orange douce	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Plant de semis	Degache- Tozeur
178	Aranj fdp	ZAD3	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Greffage	Degache- Tozeur
179	Orange "Chammème karess"	ABD1	Orange douce	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Inconnue	Degache- Tozeur
180	Orange "Chammème hlou"	ABD2	Orange douce	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Inconnue	Degache- Tozeur
181	Aranj fdp	ABD3	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Greffage	Degache- Tozeur
182	Lime "Chiiri"	ISSA1	Lime	<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	Marcottage	Degache- Tozeur
183	Citronnier de la région	ARRM1	Citron	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	Marcottage	Mérith- Gabes
184	Aranj fdp	ARROU1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Greffage	Kettana- Gabes
185	Citronnier fdp	ARROU2	Citron	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	Marcottage	Kettana- Gabes
186	Aranj fdp	BMJ1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Greffage	El-Mahboubine- Djerba
187	Aranj fdp	ABDH1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Greffage	El-Mahboubine- Djerba
188	Aranj fdp	FFJ1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Greffage	El-Mahboubine- Djerba
189	Aranj fdp	MBCH1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Greffage	Chnini- Gabes
190	Citronnier	MBCH2	Citron	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	Marcottage	Chnini- Gabes
191	Aranj "Arbi"	KJH1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Hammamet
192	Aranj "Souri"	KJH2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Hammamet
193	Aranj "Arbi"	SHJ1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Hammamet
194	Aranj "Souri"	SHJ2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Hammamet
195	Aranj "Souri"	OTHK1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Hammamet
196	Aranj rejet (âgé plus de 50 ans)	OTHK2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Greffage	Hammamet
197	Aranj fdp	SKAH1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Hammamet
198	Aranj fdp	AMH1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Hammamet
199	Aranj "Arbi" (âgé plus de 40 ans)	FMH1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Hammamet
200	Aranj "Arbi"	FGH1	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Plant de semis	Hammamet
201	Aranj rejet (greffage en pont)	FGH2	Bigaradier	<i>Citrus aurantium</i> L.	Greffage	Hammamet

*fdp: franc de pied

Annexe II- Fréquences alléliques par locus pour chaque groupe variétal, paramètres de polymorphisme et indice de mesure de la différenciation génétique, pour les 20 loci SSRs analysés (GENETIX).

LOCUS	groupes variétaux				
	1	2	3	4	Tous
01C06					
(N)	169	12	12	8	Tous
131	0.5089	0.0000	0.0000	0.1250	0.1585
133	0.0030	0.5000	0.0000	0.0000	0.1257
137	0.0947	0.0000	0.0000	0.0000	0.0237
148	0.0000	0.0000	0.0000	0.1250	0.0313
159	0.3935	0.5000	0.5000	0.0000	0.3484
167	0.0000	0.0000	0.5000	0.3750	0.2188
169	0.0000	0.0000	0.0000	0.3750	0.0938
H exp.	0.5772	0.5000	0.5000	0.6875	
H n.b.	0.5790	0.5217	0.5217	0.7333	
H obs.	0.9763	1.0000	1.0000	1.0000	
Hs=	0.5662	Ht=	0.7795	Gst =	0.2737
Hs(nc)=	0.5717	Ht(nc)=	0.7809	Gst(nc) =	0.2679
01C07					
(N)	169	12	12	8	Tous
260	0.5059	0.0000	0.5000	0.1250	0.2827
262	0.0030	0.0000	0.0000	0.0000	0.0007
264	0.0000	0.0000	0.0000	0.1250	0.0313
280	0.0000	0.5000	0.0000	0.7500	0.3125
282	0.0000	0.0000	0.5000	0.0000	0.1250
292	0.4882	0.0000	0.0000	0.0000	0.1220
298	0.0030	0.5000	0.0000	0.0000	0.1257
H exp.	0.5057	0.5000	0.5000	0.4063	
H n.b.	0.5072	0.5217	0.5217	0.4333	

H obs. 0.9882 1.0000 1.0000 0.5000
Hs= 0.4780 Ht= 0.7751 Gst = 0.3833
Hs(nc)= 0.4814 Ht(nc)= 0.7759 Gst(nc) = 0.3796

01D06a

(N)	169	12	12	8	Tous
244	0.0000	0.0000	0.0000	0.2500	0.0625
248	0.0000	0.0000	0.5000	0.5000	0.2500
254	0.0059	1.0000	0.0000	0.0000	0.2515
256	0.9941	0.0000	0.5000	0.1250	0.4048
258	0.0000	0.0000	0.0000	0.1250	0.0313

H exp. 0.0118 0.0000 0.5000 0.6563
H n.b. 0.0118 0.0000 0.5217 0.7000
H obs. 0.0118 0.0000 1.0000 1.0000
Hs= 0.2920 Ht= 0.7055 Gst = 0.5861
Hs(nc)= 0.2953 Ht(nc)= 0.7064 Gst(nc) = 0.5820

01 E02

(N)	169	12	12	8	Tous
172	0.5059	0.5000	0.0000	0.2500	0.3140
176	0.0000	0.0000	0.0000	0.5000	0.1250
178	0.4941	0.0000	1.0000	0.2500	0.4360
188	0.0000	0.5000	0.0000	0.0000	0.1250

H exp. 0.4999 0.5000 0.0000 0.6250
H n.b. 0.5014 0.5217 0.0000 0.6667
H obs. 0.9882 1.0000 0.0000 0.5000
Hs= 0.4062 Ht= 0.6801 Gst = 0.4026
Hs(nc)= 0.4139 Ht(nc)= 0.6820 Gst(nc) = 0.3931

01F04a

(N)	169	12	12	8	Tous
190	0.0000	0.0000	0.0000	0.3750	0.0938
205	0.0030	0.5000	0.5000	0.5000	0.3757
210	0.5059	0.0000	0.0000	0.0000	0.1265
216	0.0000	0.5000	0.1250	0.0000	0.1563
217	0.4882	0.0000	0.3750	0.1250	0.2470
228	0.0030	0.0000	0.0000	0.0000	0.0007
H exp.	0.5057	0.5000	0.5938	0.5938	
H n.b.	0.5072	0.5217	0.6196	0.6333	
H obs.	0.9763	1.0000	1.0000	1.0000	
Hs=	0.5483	Ht=	0.7486	Gst =	0.2675
Hs(nc)=	0.5524	Ht(nc)=	0.7496	Gst(nc) =	0.2631

01F08a

(N)	169	12	12	8	Tous
136	0.5059	0.5000	0.5000	0.1250	0.4077
140	0.4911	0.0000	0.0000	0.0000	0.1228
145	0.0000	0.0000	0.0000	0.1250	0.0313
148	0.0000	0.0000	0.5000	0.7500	0.3125
156	0.0030	0.5000	0.0000	0.0000	0.1257
H exp.	0.5028	0.5000	0.5000	0.4063	
H n.b.	0.5043	0.5217	0.5217	0.4333	
H obs.	0.9882	1.0000	1.0000	0.5000	
Hs=	0.4773	Ht=	0.7042	Gst =	0.3223
Hs(nc)=	0.4806	Ht(nc)=	0.7051	Gst(nc) =	0.3184

01H05

(N)	169	12	12	8	Tous
100	0.4941	1.0000	0.0000	0.0000	0.3735
102	0.5059	0.0000	0.5000	0.1250	0.2827
130	0.0000	0.0000	0.0000	0.3750	0.0938

136	0.0000	0.0000	0.5000	0.1250	0.1563
981	0.0000	0.0000	0.0000	0.3750	0.0938
H exp.	0.4999	0.0000	0.5000	0.6875	
H n.b.	0.5014	0.0000	0.5217	0.7333	
H obs.	0.9763	0.0000	1.0000	1.0000	
Hs=	0.4219	Ht=	0.7386	Gst =	0.4288
Hs(nc)= 0.4259 Ht(nc)= 0.7396 Gst(nc) = 0.4242					

06B05

(N)	169	12	12	8	Tous
187	0.5059	1.0000	0.5000	1.0000	0.7515
199	0.4941	0.0000	0.5000	0.0000	0.2485
H exp.	0.4999	0.0000	0.5000	0.0000	
H n.b.	0.5014	0.0000	0.5217	0.0000	
H obs.	0.9882	0.0000	1.0000	0.0000	
Hs=	0.2500	Ht=	0.3735	Gst =	0.3307
Hs(nc)= 0.2501 Ht(nc)= 0.3735 Gst(nc) = 0.3305					

07D06

(N)	169	12	12	8	Tous
164	0.4970	0.0000	0.5000	0.1250	0.2805
166	0.0030	0.5000	0.0000	0.0000	0.1257
168	0.0000	0.0000	0.5000	0.1250	0.1563
172	0.0000	0.0000	0.0000	0.7500	0.1875
188	0.0030	0.5000	0.0000	0.0000	0.1257
196	0.4970	0.0000	0.0000	0.0000	0.1243
H exp.	0.5059	0.5000	0.5000	0.4063	
H n.b.	0.5074	0.5217	0.5217	0.4333	
H obs.	0.9822	1.0000	1.0000	0.5000	
Hs=	0.4780	Ht=	0.8147	Gst =	0.4132
Hs(nc)= 0.4815 Ht(nc)= 0.8155 Gst(nc) = 0.4096					

07D07

(N)	169	12	12	8	Tous
220	0.0030	0.5000	0.0000	0.0000	0.1257
222	0.5000	0.0000	0.0000	0.2500	0.1875
226	0.0000	0.0000	0.5000	0.6250	0.2813
230	0.0000	0.5000	0.0000	0.0000	0.1250
234	0.0000	0.0000	0.0000	0.1250	0.0313
240	0.4970	0.0000	0.5000	0.0000	0.2493
H exp.	0.5029	0.5000	0.5000	0.5313	
H n.b.	0.5044	0.5217	0.5217	0.5667	
H obs.	1.0000	1.0000	1.0000	0.2500	
Hs=	0.5085	Ht=	0.7912	Gst =	0.3572
Hs(nc)= 0.5168 Ht(nc)= 0.7933 Gst(nc) = 0.3485					

2A09

(N)	169	12	12	8	Tous
155	0.4882	0.0000	0.0000	0.0000	0.1220
157	0.5089	0.0000	0.5000	0.1250	0.2835
159	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.2500
161	0.0030	0.0000	0.5000	0.7500	0.3132
177	0.0000	0.0000	0.0000	0.1250	0.0313
H exp.	0.5027	0.0000	0.5000	0.4063	
H n.b.	0.5042	0.0000	0.5217	0.4333	
H obs.	0.9763	0.0000	1.0000	0.5000	
Hs=	0.3522	Ht=	0.7432	Gst =	0.5260
Hs(nc)= 0.3557 Ht(nc)= 0.7440 Gst(nc) = 0.5219					

2D04B

(N)	169	12	12	8	Tous
201	0.5000	0.5000	1.0000	0.0000	0.5000
209	0.0000	0.5000	0.0000	0.0000	0.1250
211	0.4970	0.0000	0.0000	0.2500	0.1868

228	0.0030	0.0000	0.0000	0.0000	0.0007
232	0.0000	0.0000	0.0000	0.7500	0.1875
H exp.	0.5029	0.5000	0.0000	0.3750	
H n.b.	0.5044	0.5217	0.0000	0.4000	
H obs.	0.9763	1.0000	0.0000	0.0000	
Hs=	0.3445	Ht= 0.6643	Gst = 0.4815		
Hs(nc)=	0.3523	Ht(nc)= 0.6663	Gst(nc) = 0.4712		

2D09

(N)	169	12	12	8	Tous
230	0.0059	1.0000	0.0000	0.0000	0.2515
232	0.0000	0.0000	0.0000	0.5000	0.1250
234	0.0000	0.0000	0.5000	0.0000	0.1250
236	0.9941	0.0000	0.5000	0.1250	0.4048
238	0.0000	0.0000	0.0000	0.2500	0.0625
248	0.0000	0.0000	0.0000	0.1250	0.0313
H exp.	0.0118	0.0000	0.5000	0.6563	
H n.b.	0.0118	0.0000	0.5217	0.7000	
H obs.	0.0000	0.0000	1.0000	1.0000	
Hs=	0.2920	Ht= 0.7368	Gst = 0.6037		
Hs(nc)=	0.2954	Ht(nc)= 0.7376	Gst(nc) = 0.5996		

2G12

(N)	169	12	12	8	Tous
226	0.0000	0.0000	0.5000	0.7500	0.3125
241	0.0030	0.5000	0.0000	0.0000	0.1257
244	0.5030	0.0000	0.0000	0.1250	0.1570
248	0.0000	0.0000	0.0000	0.1250	0.0313
250	0.4941	0.5000	0.5000	0.0000	0.3735
H exp.	0.5029	0.5000	0.5000	0.4063	
H n.b.	0.5044	0.5217	0.5217	0.4333	
H obs.	0.9822	1.0000	1.0000	0.5000	

Hs= 0.4773 Ht= 0.7214 Gst = 0.3384
Hs(nc)= 0.4807 Ht(nc)= 0.7222 Gst(nc) = 0.3345

3C08

(N)	169	12	12	8	Tous
199	0.0000	0.0000	0.0000	0.1250	0.0313
207	0.0030	0.5000	0.0000	0.0000	0.1257
209	0.0000	0.0000	0.5000	0.2500	0.1875
211	0.0000	0.5000	0.0000	0.0000	0.1250
214	0.5000	0.0000	0.5000	0.0000	0.2500
220	0.4941	0.0000	0.0000	0.1250	0.1548
223	0.0000	0.0000	0.0000	0.1250	0.0313
225	0.0030	0.0000	0.0000	0.0000	0.0007
241	0.0000	0.0000	0.0000	0.3750	0.0938
H exp.	0.5059	0.5000	0.5000	0.7500	
H n.b.	0.5074	0.5217	0.5217	0.8000	
H obs.	0.9941	1.0000	1.0000	1.0000	
Hs= 0.5640		Ht= 0.8362		Gst = 0.3256	
Hs(nc)= 0.5692		Ht(nc)= 0.8375		Gst(nc) = 0.3204	

3D12a

(N)	169	12	12	8	Tous
243	0.0000	0.0000	0.5000	0.8750	0.3438
253	0.5000	0.5000	0.5000	0.0000	0.3750
261	0.0000	0.5000	0.0000	0.0000	0.1250
263	0.4970	0.0000	0.0000	0.1250	0.1555
280	0.0030	0.0000	0.0000	0.0000	0.0007
H exp.	0.5029	0.5000	0.5000	0.2188	
H n.b.	0.5044	0.5217	0.5217	0.2333	
H obs.	0.9763	1.0000	1.0000	0.2500	
Hs= 0.4304		Ht= 0.7014		Gst = 0.3863	
Hs(nc)= 0.4326		Ht(nc)= 0.7019		Gst(nc) = 0.3837	

3G05

(N)	169	12	12	8	Tous
199	0.0000	0.5000	0.0000	0.0000	0.1250
215	0.0000	0.0000	0.0000	0.3750	0.0938
219	0.0118	0.0000	0.5000	0.6250	0.2842
220	0.4911	0.0000	0.0000	0.0000	0.1228
222	0.4911	0.0000	0.5000	0.0000	0.2478
226	0.0030	0.0000	0.0000	0.0000	0.0007
228	0.0030	0.5000	0.0000	0.0000	0.1257
H exp.	0.5174	0.5000	0.5000	0.4688	
H n.b.	0.5190	0.5217	0.5217	0.5000	
H obs.	0.9822	1.0000	1.0000	0.7500	
Hs= 0.4965	Ht= 0.8025		Gst = 0.3813		
Hs(nc)= 0.4990	Ht(nc)= 0.8031		Gst(nc) = 0.3787		

MEST121

(N)	169	12	12	8	Tous
179	0.0000	0.5000	0.0000	0.7500	0.3125
182	0.5000	0.5000	1.0000	0.1250	0.5313
185	0.5000	0.0000	0.0000	0.1250	0.1563
H exp.	0.5000	0.5000	0.0000	0.4063	
H n.b.	0.5015	0.5217	0.0000	0.4333	
H obs.	0.9882	1.0000	0.0000	0.5000	
Hs= 0.3516	Ht=0.5957		Gst =0.4098		
Hs(nc)= 0.3548	Ht(nc)= 0.5965		Gst(nc) = 0.4052		

MEST431

(N)	169	12	12	8	Tous
331	0.5000	0.5000	0.5000	0.1250	0.4063
342	0.0030	0.5000	0.0000	0.0000	0.1257
345	0.4970	0.0000	0.0000	0.0000	0.1243
348	0.0000	0.0000	0.5000	0.2500	0.1875

351	0.0000	0.0000	0.0000	0.2500	0.0625
354	0.0000	0.0000	0.0000	0.3750	0.0938
H exp.	0.5029	0.5000	0.5000	0.7188	
H n.b.	0.5044	0.5217	0.5217	0.7667	
H obs.	0.9882	1.0000	1.0000	1.0000	
Hs= 0.5554	Ht= 0.7559	Gst =0.2652			
Hs(nc)= 0.5600	Ht(nc)= 0.7570	Gst(nc) = 0.2602			

458

(N)	169	12	12	8	Tous
205	0.0000	0.0000	0.5000	0.3750	0.2188
208	0.0030	0.0000	0.0000	0.0000	0.0007
211	0.0000	0.0000	0.0000	0.1250	0.0313
214	0.0030	0.5000	0.0000	0.0000	0.1257
217	0.0000	0.5000	0.0000	0.0000	0.1250
223	0.4911	0.0000	0.0000	0.0000	0.1228
230	0.0000	0.0000	0.0000	0.3750	0.0938
232	0.5030	0.0000	0.5000	0.1250	0.2820
H exp.	0.5058	0.5000	0.5000	0.6875	
H n.b.	0.5073	0.5217	0.5217	0.7333	
H obs.	0.9822	1.0000	1.0000	1.0000	
Hs= 0.5483	Ht=0.8164	Gst =0.3283			
Hs(nc)= 0.5524	Ht(nc)= 0.8174	Gst(nc) = 0.3242			

Groupe variétal 1: Bigarades, groupe variétal 2: Oranges, groupe variétal 3: Citrons, groupe variétal 4: Limes. N: Tous les allèles détectés dans l'échantillon par locus ; Hexp: hétérozygotie attendue sous l'hypothèse de Hardy-Weinberg; Hn.b.: Hexp corrigée pour le biais d'échantillonnage; Hobs: Hétérozygotie observée. Gst: estimateur du paramètre Fst; Hs= moyenne de la diversité génétique monolocus par groupe variétal; Ht= moyenne de la diversité génétique monolocus sur la population totale sur l'ensemble des loci. Hs(nc), Ht(nc) et Gst(nc) sont des estimateurs corrigés tenant compte des biais relatifs à l'échantillonnage d'individus ou de loci.

Annexe III- Variances sur *Fit*, *Fis* et *Fst* par ré-échantillonnage selon la méthode du Jackknife sur les loci (GENETIX)

Sans loc 01C06	FIS= -0.92111	FIT= -0.06395	FST= 0.44618
Sans loc 01C07	FIS= -0.90600	FIT= -0.06837	FST= 0.43947
Sans loc 01D06a	FIS= -0.90943	FIT= -0.10743	FST= 0.42002
Sans loc 01E02	FIS= -0.90719	FIT= -0.06042	FST= 0.44399
Sans loc 01F04a	FIS= -0.90778	FIT= -0.06658	FST= 0.44093
Sans loc 01F08a	FIS= -0.90544	FIT= -0.06159	FST= 0.44286
Sans loc 01H05	FIS= -0.90657	FIT= -0.06268	FST= 0.44262
Sans loc 06B05	FIS= -0.90393	FIT= -0.05331	FST= 0.44677
Sans loc 07D06	FIS= -0.90662	FIT= -0.06915	FST= 0.43924
Sans loc 07D07	FIS= -0.90659	FIT= -0.06671	FST= 0.44052
Sans loc 2A09	FIS= -0.90693	FIT= -0.07760	FST= 0.43490
Sans loc 2D04B	FIS= -0.90905	FIT= -0.06557	FST= 0.44183
Sans loc 2D09	FIS= -0.91056	FIT= -0.10836	FST= 0.41988
Sans loc 2G12	FIS= -0.90605	FIT= -0.06235	FST= 0.44264
Sans loc 3C08	FIS= -0.90617	FIT= -0.06494	FST= 0.44132
Sans loc 3D12a	FIS= -0.90614	FIT= -0.06438	FST= 0.44160
Sans loc 3G05	FIS= -0.90820	FIT= -0.06901	FST= 0.43978
Sans loc 121	FIS= -0.90523	FIT= -0.06274	FST= 0.44220
Sans loc 431	FIS= -0.90592	FIT= -0.05871	FST= 0.44452
Sans loc 458	FIS= -0.90678	FIT= -0.06579	FST= 0.44105
Moyenne:	-0.90758	-0.068982	0.439616
Ecart-type	0.00353	0.01414	0.0072
Intervalle. confiance (95%)	0.0154	0.0619	0.0315

Annexe IV- Estimations de Weir & Cockerham (1984) de Fit (CapF), Fst (thêta) et Fis (smallF), du degré de rapprochement (Relat) selon Queller & Goodnight (1989), du rapprochement de consanguinité corrigé (Relatc) (Pamilo, 1984,1985), et des composants de la variance entre échantillons (sig_a), entre individus au sein d'un échantillon (sig_b) et à l'intérieur des individus (sig_w) (FSTAT)

Pour Locus-01C06

Allèle	Capf	Thêta	Smallf	Relat	Relatc	Sig_a	Sig_b	Sig_w
131	-0.277	0.336	-0.924	0.930				
133	0.512	0.737	-0.855	0.975				
137	-0.058	0.033	-0.095	0.070				
148	0.222	0.313	-0.133	0.512				
159	-0.527	0.096	-0.689	0.405				
167	0.499	0.728	-0.843	0.972				
169	0.470	0.667	-0.594	0.908				
Tous	-0.161	0.320	-0.707	0.763	0.829	0.270	-0.406	0.980

Pour Locus-01C07

Allèle	Capf	Thêta	Smallf	Relat	Relatc	Sig_a	Sig_b	Sig_w
260	-0.521	0.225	-0.962	0.938				
262	-0.018	-0.025	0.007	-0.052				
264	0.222	0.313	-0.133	0.512				
280	0.718	0.841	-0.774	0.979				
282	0.536	0.768	-1.000	1.000				
292	-0.274	0.347	-0.953	0.958				
298	0.512	0.737	-0.855	0.975				
Tous	-0.080	0.442	-0.935	0.960	0.966	0.397	-0.469	0.970

Pour Locus-01D06a

Allèle	Capf	Thêta	Smallf	Relat	Relatc	Sig_a	Sig_b	Sig_w
244	0.369	0.524	-0.324	0.765				

254	0.975	0.975	0.004	0.987				
256	0.881	0.927	-0.637	0.986				
258	0.222	0.313	-0.133	0.512				
Tous	0.834	0.900	-0.656	0.981	0.792	0.595	-0.043	0.109

Pour Locus-01 E02

Allèle	Capf	Thêta	Smallf	Relat	Relatc	Sig_a	Sig_b	Sig_w
172	-0.539	0.195	-0.913	0.848				
176	0.771	0.768	0.010	0.868				
178	-0.287	0.341	-0.954	0.957				
188	0.536	0.768	-1.000	1.000				
Tous	-0.251	0.346	-0.915	0.926	0.956	0.252	-0.435	0.910

Pour Locus-01F04a

Allèle	Capf	Thêta	Smallf	Relat	Relatc	Sig_a	Sig_b	Sig_w
190	0.470	0.667	-0.594	0.908				
205	0.482	0.733	-0.940	0.989				
210	-0.227	0.363	-0.928	0.941				
216	0.483	0.702	-0.735	0.947				
217	-0.508	0.213	-0.915	0.864				
228	-0.018	-0.025	0.007	-0.052				
Tous	-0.111	0.417	-0.904	0.937	0.950	0.368	-0.465	0.980

Pour Locus-01F08a

Allèle	Capf	Thêta	Smallf	Relat	Relatc	Sig_a	Sig_b	Sig_w
136	-0.821	0.073	-0.964	0.813				
140	-0.276	0.350	-0.964	0.968				
145	0.222	0.313	-0.133	0.512				
148	0.718	0.841	-0.774	0.979				
156	0.512	0.737	-0.855	0.975				

Tous	-0.211	0.377	-0.944	0.956	0.971	0.302	-0.471	0.970
------	--------	-------	--------	-------	-------	-------	--------	-------

Pour Locus- 01H05

Allèle	Capf	Thêta	Smallf	Relat	Relatc	Sig_a	Sig_b	Sig_w
98	0.470	0.667	-0.594	0.908				
100	-0.180	0.396	-0.952	0.965				
102	-0.505	0.224	-0.939	0.905				
130	0.470	0.667	-0.594	0.908				
136	0.500	0.723	-0.803	0.964				
Tous	-0.196	0.379	-0.926	0.943	0.962	0.292	-0.442	0.920

Pour Locus-06B05

Allèle	Capf	Thêta	Smallf	Relat	Relatc	Sig_a	Sig_b	Sig_w
187	-0.474	0.255	-0.978	0.968				
199	-0.474	0.255	-0.978	0.968				
Tous	-0.474	0.255	-0.978	0.968	0.989	0.154	-0.440	0.891

Pour Locus-07D06

Allèle	Capf	Thêta	Smallf	Relat	Relatc	Sig_a	Sig_b	Sig_w
164	-0.508	0.218	-0.928	0.886				
166	0.512	0.737	-0.855	0.975				
168	0.500	0.723	-0.803	0.964				
172	0.880	0.909	-0.324	0.967				
188	0.512	0.737	-0.855	0.975				
196	-0.265	0.356	-0.964	0.968				
Tous	-0.067	0.446	-0.924	0.955	0.961	0.403	-0.464	0.965

Pour Locus-07D07

Allèle	Capf	Thêta	Smallf	Relat	Relatc	Sig_a	Sig_b	Sig_w
220	0.512	0.737	-0.855	0.975				
222	-0.339	0.307	-0.930	0.927				

226	0.711	0.798	-0.428	0.932				
230	0.536	0.768	-1.000	1.000				
234	0.222	0.313	-0.133	0.512				
240	-0.478	0.257	-0.989	0.984				
Tous	-0.109	0.424	-0.925	0.951	0.961	0.371	-0.466	0.970

Pour Locus-2A09

Allèle	Capf	Thêta	Smallf	Relat	Relatc	Sig_a	Sig_b	Sig_w
155	-0.274	0.347	-0.953	0.958				
157	-0.493	0.226	-0.929	0.891				
161	0.703	0.825	-0.695	0.969				
177	0.222	0.313	-0.133	0.512				
Tous	0.067	0.514	-0.920	0.963	0.958	0.496	-0.431	0.900

Pour Locus-2D04B

Allèle	Capf	Thêta	Smallf	Relat	Relatc	Sig_a	Sig_b	Sig_w
201	-0.411	0.278	-0.955	0.945				
209	0.536	0.768	-1.000	1.000				
211	-0.305	0.303	-0.872	0.872				
228	-0.018	-0.025	0.007	-0.052				
232	1.000	0.908	1.000	0.908				
Tous	-0.137	0.395	-0.881	0.916	0.937	0.306	-0.412	0.881

Pour Locus-2D09

Allèle	Capf	Thêta	Smallf	Relat	Relatc	Sig_a	Sig_b	Sig_w
230	1.000	0.975	1.000	0.975				
234	0.536	0.768	-1.000	1.000				
236	0.896	0.927	-0.429	0.978				
238	0.369	0.524	-0.324	0.765				
248	0.222	0.313	-0.133	0.512				

Tous	0.850	0.900	-0.503	0.973	0.670	0.599	-0.033	0.100
------	-------	-------	--------	-------	-------	-------	--------	-------

Pour Locus-2G12

Allèle	Capf	Thêta	Smallf	Relat	Relatc	Sig_a	Sig_b	Sig_w
--------	------	-------	--------	-------	--------	-------	-------	-------

226	0.718	0.841	-0.774	0.979				
-----	-------	-------	--------	-------	--	--	--	--

241	0.512	0.737	-0.855	0.975				
-----	-------	-------	--------	-------	--	--	--	--

244	-0.303	0.331	-0.947	0.949				
-----	--------	-------	--------	-------	--	--	--	--

248	0.222	0.313	-0.133	0.512				
-----	-------	-------	--------	-------	--	--	--	--

250	-0.724	0.120	-0.958	0.866				
-----	--------	-------	--------	-------	--	--	--	--

Tous	-0.196	0.382	-0.934	0.949	0.966	0.308	-0.466	0.965
------	--------	-------	--------	-------	-------	-------	--------	-------

Pour Locus-3C08

Allèle	Capf	Thêta	Smallf	Relat	Relatc	Sig_a	Sig_b	Sig_w
--------	------	-------	--------	-------	--------	-------	-------	-------

199	0.222	0.313	-0.133	0.512				
-----	-------	-------	--------	-------	--	--	--	--

207	0.512	0.737	-0.855	0.975				
-----	-------	-------	--------	-------	--	--	--	--

209	0.490	0.712	-0.774	0.956				
-----	-------	-------	--------	-------	--	--	--	--

211	0.536	0.768	-1.000	1.000				
-----	-------	-------	--------	-------	--	--	--	--

214	-0.466	0.259	-0.977	0.969				
-----	--------	-------	--------	-------	--	--	--	--

220	-0.327	0.323	-0.959	0.959				
-----	--------	-------	--------	-------	--	--	--	--

223	0.222	0.313	-0.133	0.512				
-----	-------	-------	--------	-------	--	--	--	--

225	-0.018	-0.025	0.007	-0.052				
-----	--------	--------	-------	--------	--	--	--	--

241	0.470	0.667	-0.594	0.908				
-----	-------	-------	--------	-------	--	--	--	--

Tous	-0.140	0.409	-0.931	0.953	0.964	0.357	-0.480	0.995
------	--------	-------	--------	-------	-------	-------	--------	-------

Pour Locus-3D12a

Allèle	Capf	Thêta	Smallf	Relat	Relatc	Sig_a	Sig_b	Sig_w
--------	------	-------	--------	-------	--------	-------	-------	-------

243	0.788	0.882	-0.803	0.987				
-----	-------	-------	--------	-------	--	--	--	--

253	-0.719	0.122	-0.958	0.868				
-----	--------	-------	--------	-------	--	--	--	--

261	0.536	0.768	-1.000	1.000				
-----	-------	-------	--------	-------	--	--	--	--

263	-0.298	0.325	-0.923	0.926				
-----	--------	-------	--------	-------	--	--	--	--

280	-0.018	-0.025	0.007	-0.052				
Tous	-0.155	0.402	-0.933	0.953	0.965	0.331	-0.459	0.950

Pour Locus-3G05

Allèle	Capf	Thêta	Smallf	Relat	Relatc	Sig_a	Sig_b	Sig_w
199	0.536	0.768	-1.000	1.000				
215	0.470	0.667	-0.594	0.908				
219	0.646	0.729	-0.305	0.885				
220	-0.261	0.350	-0.940	0.947				
222	-0.470	0.252	-0.967	0.953				
226	-0.018	-0.025	0.007	-0.052				
228	0.512	0.737	-0.855	0.975				
Tous	-0.069	0.437	-0.897	0.938	0.946	0.398	-0.461	0.975

Pour Locus- MEST121

Allèle	Capf	Thêta	Smallf	Relat	Relatc	Sig_a	Sig_b	Sig_w
179	0.718	0.841	-0.774	0.979				
182	-0.497	0.237	-0.961	0.941				
185	-0.316	0.328	-0.959	0.959				
Tous	-0.196	0.387	-0.951	0.963	0.975	0.295	-0.444	0.910

Pour Locus- MEST431

Allèle	Capf	Thêta	Smallf	Relat	Relatc	Sig_a	Sig_b	Sig_w
331	-0.824	0.071	-0.964	0.808				
342	0.512	0.737	-0.855	0.975				
345	-0.265	0.356	-0.964	0.968				
348	0.490	0.712	-0.774	0.956				
351	0.369	0.524	-0.324	0.765				
354	0.470	0.667	-0.594	0.908				
Tous	-0.273	0.342	-0.936	0.942	0.967	0.266	-0.479	0.990

Pour Locus- MEST458

Allèle	Capf	Thêta	Smallf	Relat	Relatc	Sig_a	Sig_b	Sig_w
205	0.499	0.728	-0.843	0.972				
208	-0.018	-0.025	0.007	-0.052				
211	0.222	0.313	-0.133	0.512				
214	0.512	0.737	-0.855	0.975				
217	0.536	0.768	-1.000	1.000				
223	-0.276	0.350	-0.964	0.968				
230	0.470	0.667	-0.594	0.908				
232	-0.500	0.222	-0.928	0.888				
Tous	-0.125	0.414	-0.921	0.947	0.959	0.363	-0.472	0.985

Pour l'ensemble des loci

Capf	Thêta	Smallf	Relat	Relatc	Sig_a	Sig_b	Sig_w
-0.069	0.440	-0.908	0.944	0.959	7.122	-8.240	17.318

Annexe V- Richesse allélique par locus par groupe variétal et pour l'ensemble de l'échantillon, basée sur une taille minimale de l'échantillon de 8 individus diploïdes (FSTAT)

	Gv1	Gv2	Gv3	Gv4	Tous
Locus-01C06	2.851	2.000	2.000	4.000	3.978
Locus-01C07	2.095	2.000	2.000	3.000	3.556
Locus-01D06a	1.093	1.000	2.000	4.000	2.458
Locus-01 E02	2.000	2.000	1.000	3.000	2.669
Locus-01F04a	2.095	2.000	2.972	3.000	3.472
Locus-01F08a	2.047	2.000	2.000	3.000	3.127
Locus- 01H05	2.000	1.000	2.000	4.000	2.874
Locus-06B05	2.000	1.000	2.000	1.000	2.000
Locus-07D06	2.095	2.000	2.000	3.000	3.659
Locus-07D07	2.047	2.000	2.000	3.000	3.484
Locus-2A09	2.047	1.000	2.000	3.000	3.361
Locus-2D04B	2.047	2.000	1.000	2.000	2.820
Locus-2D09	1.093	1.000	2.000	4.000	2.562
Locus-2G12	2.047	2.000	2.000	3.000	3.127
Locus-3C08	2.095	2.000	2.000	5.000	3.703
Locus-3D12a	2.047	2.000	2.000	2.000	3.094
Locus-3G05	2.272	2.000	2.000	2.000	3.726
Locus- MEST121	2.000	2.000	1.000	3.000	2.634
Locus- MEST431	2.047	2.000	2.000	4.000	3.267
Locus- MEST458	2.095	2.000	2.000	4.000	3.667

Annexe VI- Nombre d'allèles à chaque locus dans chaque échantillon et pour l'ensemble des échantillons (FSTAT). Gv: Groupe variétal. Gv1: Bigarades, Gv2: Oranges, Gv3: Citrons, Gv 4: Limes.

	Gv1	Gv2	Gv3	Gv4	Tous
Locus-01C06	4	2	2	4	7
Locus-01C07	4	2	2	3	7
Locus-01D06a	2	1	2	4	5
Locus-01 E02	2	2	1	3	4
Locus-01F04a	4	2	3	3	6
Locus-01F08a	3	2	2	3	5
Locus- 01H05	2	1	2	4	5
Locus-06B05	2	1	2	1	2
Locus-07D06	4	2	2	3	6
Locus-07D07	3	2	2	3	6
Locus-2A09	3	1	2	3	5
Locus-2D04B	3	2	1	2	5
Locus-2D09	2	1	2	4	6
Locus-2G12	3	2	2	3	5
Locus-3C08	4	2	2	5	9
Locus-3D12a	3	2	2	2	5
Locus-3G05	5	2	2	2	7
Locus- MEST121	2	2	1	3	3
Locus- MEST431	3	2	2	4	6
Locus- MEST458	4	2	2	4	8

Annexe VII- Estimation de Fis par locus après permutation des allèles à l'intérieur de chaque groupe variétal (Gv)

Résultats sur la totalité des loci :

Groupe variétal	Réel	% val. >	% val. <	% val. =
Gv 1	-0.93279	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 2	-1.00000	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 3	-0.97622	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 4	-0.20000	100.0000	0.0000	0.0000

Résultats pour le locus : 01C06

Gv 1	-0.68983	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 2	-1.00000	99.0000	0.0000	1.0000
Gv 3	-1.00000	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 4	-0.40000	93.0000	0.0000	7.0000

Résultats pour le locus : 01C07

Gv 1	-0.95369	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 2	-1.00000	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 3	-1.00000	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 4	-0.16667	40.0000	0.0000	60.0000

Résultats pour le locus : 01D06a

Gv 1	-0.00299	0.0000	0.0000	100.0000
Gv 3	-1.00000	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 4	-0.47368	99.0000	0.0000	1.0000

Résultats pour le locus : 01 E02

Gv 1	-0.97647	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 2	-1.00000	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 4	0.26316	7.0000	83.0000	10.0000

Résultats pour le locus : 01F04a

	Réel	% val. >	% val. <	% val. =
Gv 1	-0.93016	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 2	-1.00000	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 3	-0.66038	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 4	-0.64706	96.0000	0.0000	4.0000

Résultats pour le locus : 01F08a

Gv 1	-0.96498	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 2	-1.00000	99.0000	0.0000	1.0000
Gv 3	-1.00000	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 4	-0.16667	34.0000	0.0000	66.0000

Résultats pour le locus : 01H05

Gv 1	-0.95266	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 3	-1.00000	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 4	-0.40000	90.0000	0.0000	10.0000

Résultats pour le locus : 06B05

Gv 1	-0.97647	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 3	-1.00000	100.0000	0.0000	0.0000

Résultats pour le locus : 07D06

Gv 1	-0.94132	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 2	-1.00000	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 3	-1.00000	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 4	-0.16667	40.0000	0.0000	60.0000

Résultats pour le locus : 07D07

Gv 1	-0.98824	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 2	-1.00000	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 3	-1.00000	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 4	0.57576	0.0000	94.0000	6.0000

Résultats pour le locus : 2A09

	Réel	% val. >	% val. <	% val. =
Gv 1	-0.94172	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 3	-1.00000	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 4	-0.16667	41.0000	0.0000	59.0000

Résultats pour le locus : 2D04B

Gv 1	-0.94090	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 2	-1.00000	99.0000	0.0000	1.0000
Gv 4	1.00000	0.0000	99.0000	1.0000

Résultats pour le locus : 2D09

Gv 1	1.00000	0.0000	100.0000	0.0000
Gv 3	-1.00000	99.0000	0.0000	1.0000
Gv 4	-0.47368	100.000	0.0000	0.0000

Résultats pour le locus : 2G12

Gv 1	-0.95287	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 2	-1.00000	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 3	-1.00000	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 4	-0.16667	33.0000	0.0000	67.0000

Résultats pour le locus : 3C08

Gv 1	-0.96491	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 2	-1.00000	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 3	-1.00000	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 4	-0.27273	85.0000	0.0000	15.0000

Résultats pour le locus : 3D12a

Gv 1	-0.94090	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 2	-1.00000	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 3	-1.00000	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 4	-0.07692	4.0000	0.0000	96.0000

Résultats pour le locus : 3G05

	Réel	% val. >	% val. <	% val. =
Gv 1	-0.89772	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 2	-1.00000	99.0000	0.0000	1.0000
Gv 3	-1.00000	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 4	-0.55556	77.0000	0.0000	23.0000

Résultats pour le locus : 121

Gv 1	-0.97619	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 2	-1.00000	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 4	-0.16667	40.0000	0.0000	60.0000

Résultats pour le locus : 431

Gv 1	-0.96457	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 2	-1.00000	99.0000	0.0000	1.0000
Gv 3	-1.00000	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 4	-0.33333	91.0000	0.0000	9.0000

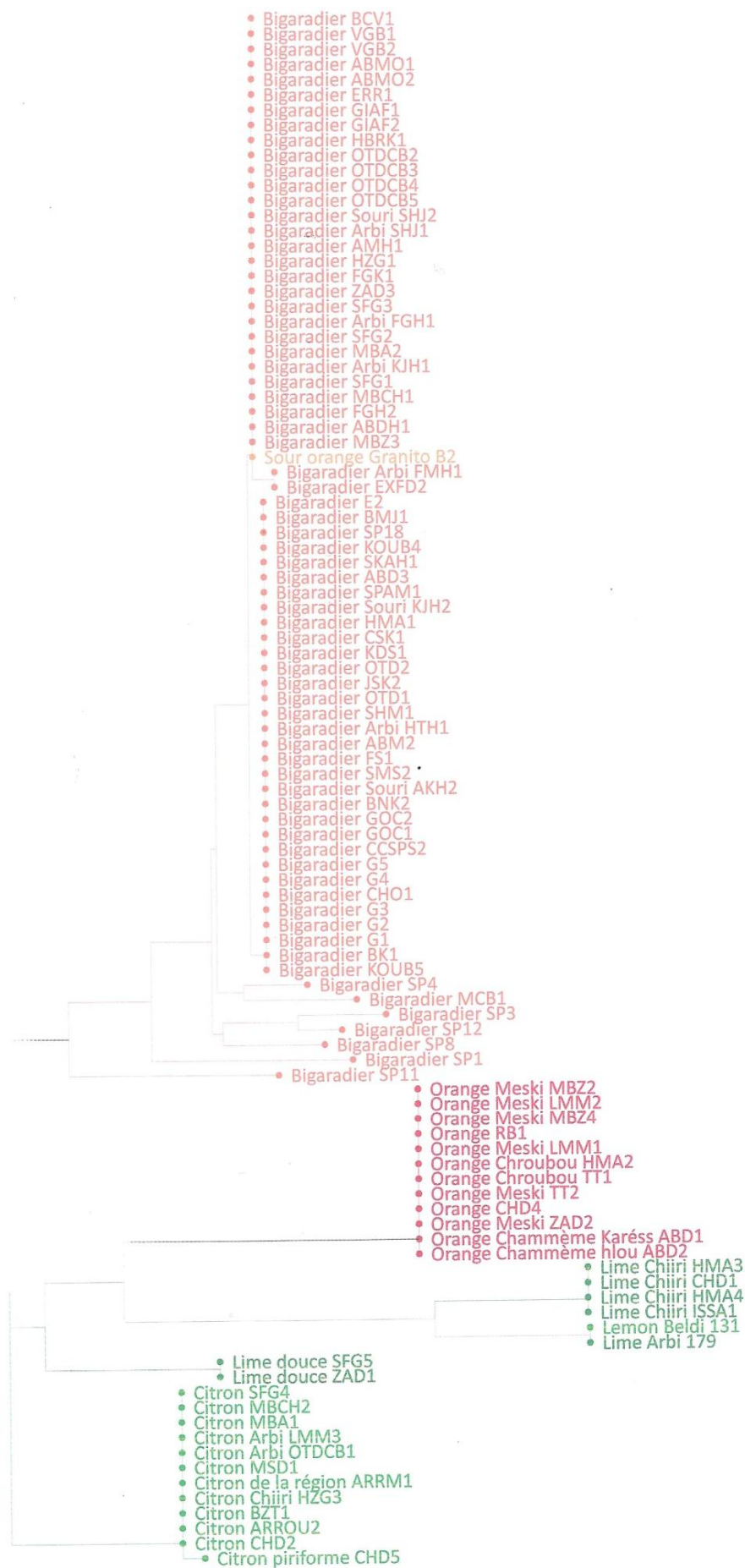
Résultats pour le locus : 458

Gv 1	-0.94159	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 2	-1.00000	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 3	-1.00000	100.0000	0.0000	0.0000
Gv 4	-0.40000	94.0000	0.0000	6.0000

Gv 1: Bigarades, Gv 2: Oranges, Gv 3: Citrons, Gv 4: Limes.

%val>, %val < ou %val=: pourcentage de valeurs respectivement supérieures, inférieures ou égales au Fis réel après 1000 permutations

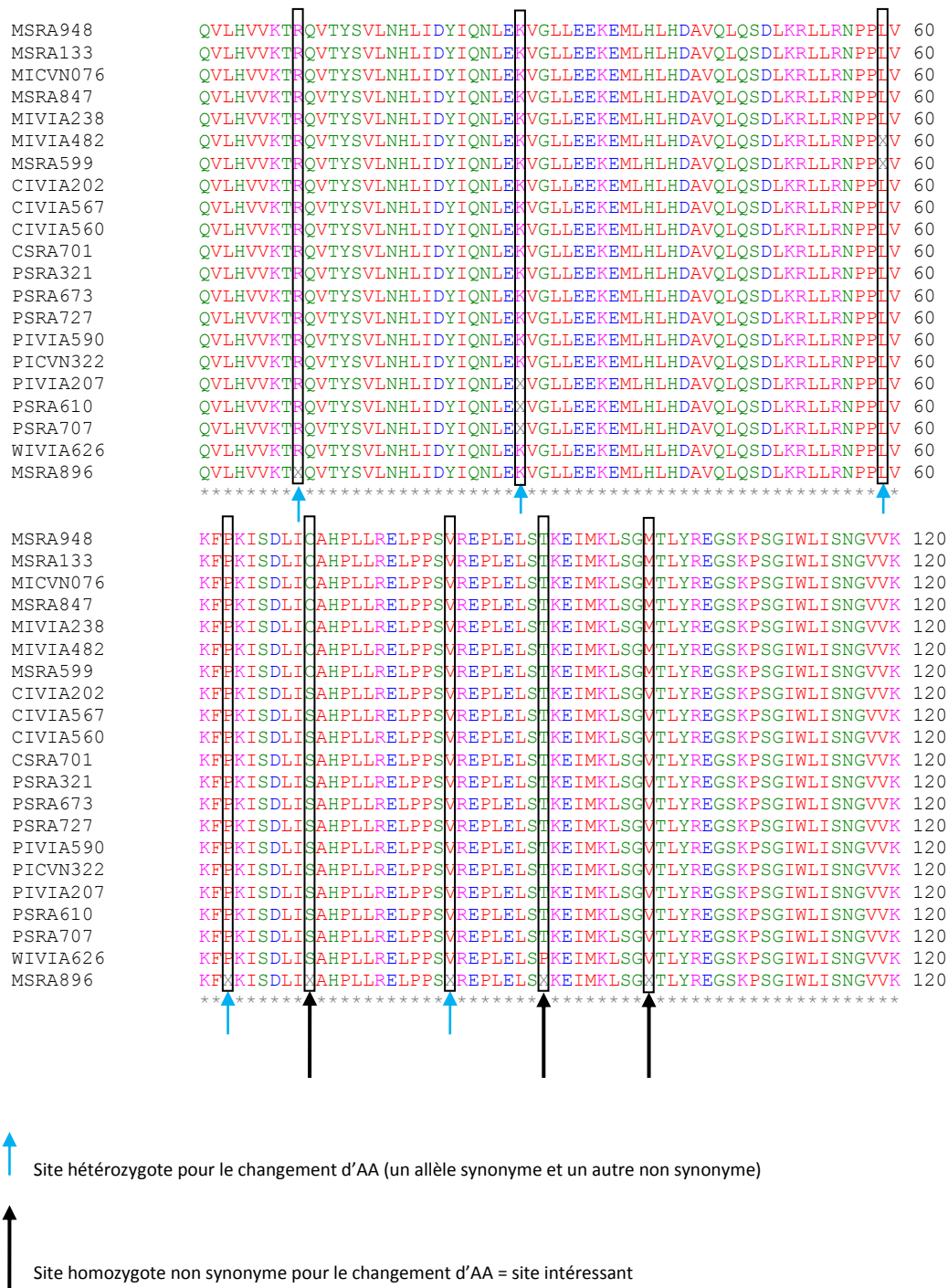
- Bigaradier SP2
- Bigaradier BOU1
- Bigaradier KOUB7
- Bigaradier SP5
- Bigaradier SP6
- Bigaradier SP7
- Bigaradier CCSPS1
- Bigaradier SP9
- Bigaradier SP10
- Bigaradier CCSPS3
- Bigaradier MJK1
- Bigaradier SP13
- Bigaradier SP14
- Bigaradier SP15
- Bigaradier SP16
- Bigaradier SP17
- Bigaradier ARROU1
- Bigaradier SP19
- Bigaradier SP20
- Bigaradier SP21
- Bigaradier SP22
- Bigaradier SP23
- Bigaradier SP24
- Bigaradier SP25
- Bigaradier SP26
- Bigaradier SP27
- Bigaradier E1
- Bigaradier KOUB3
- Bigaradier E3
- Bigaradier E4
- Bigaradier KOUB2
- Bigaradier BK2
- Bigaradier KOUB1
- Bigaradier CHO2
- Bigaradier KOUB6
- Bigaradier EXFD1
- Bigaradier RFH1
- Bigaradier G6
- Bigaradier MBZ1
- Bigaradier HBK1
- Bigaradier OTHK2
- Bigaradier MBZ5
- Bigaradier Arbi TJH1
- Bigaradier MCB2
- Bigaradier A1
- Bigaradier AB1
- Bigaradier AB2
- Bigaradier AB3
- Bigaradier GCB1
- Bigaradier Arbi HMM1
- Bigaradier Arbi HMM2
- Bigaradier AZ1
- Bigaradier AZ2
- Bigaradier ABZ1
- Bigaradier ABZ2
- Bigaradier BNK1
- Bigaradier Arbi AKH1
- Bigaradier BNK3
- Bigaradier BKA1
- Bigaradier YTC1
- Bigaradier YTC2
- Bigaradier YTC3
- Bigaradier SMS1
- Bigaradier Arbi HTH3
- Bigaradier SMS3
- Bigaradier TS1
- Bigaradier TS2
- Bigaradier TS3
- Bigaradier BA1
- Bigaradier BA2
- Bigaradier BA3
- Bigaradier RDJ1
- Bigaradier RDJ2
- Bigaradier RDJ3
- Bigaradier KB1
- Bigaradier KB2
- Bigaradier Souri OTHK1
- Bigaradier Chiiri RB2
- Bigaradier BSJ1
- Bigaradier Souri HTH2
- Bigaradier INRA1
- Bigaradier ABM1
- Bigaradier JSK3
- Bigaradier GIF1
- Bigaradier GIF2
- Bigaradier GIFJ1
- Bigaradier GIFJ2
- Bigaradier JSK1
- Bigaradier FFJ1
- Bigaradier HK1
- Bigaradier HK2
- Bigaradier JK1
- Bigaradier HZG2
- Bigaradier KDS2
- Bigaradier HJB1
- Bigaradier LTB1
- Bigaradier LTB2
- Bigaradier JPT1
- Bigaradier JPT2



0 0.2

MIVIA482	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
MSRA599	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
CLIVIA22	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
OIVIA363	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
TNO117	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
TNB11	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
POSRA470	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
POSRA293	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
BSRA952	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
TNB4	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
TNB8	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
TNB12	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
TNB43	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
TNB46	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
TNB158	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
TNB190	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
BIVIA139	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
BSRA851	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
TNB1	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
CSRA701	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
MSRA948	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
MSRA896	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
MSRA133	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
MICVN076	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
MSRA847	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
MIVIA238	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
WIVIA626	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
PSRA673	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
PIVIA590	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
PSRA610	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
PICVN322	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
PIVIA207	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
PSRA321	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
PSRA707	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
TNB3	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
PSRA727	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
CIVIA560	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
CIVIA202	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
CIVIA567	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
TNL129	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
CTIVIA297	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
CTRA16	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
TNCT111	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
TNCT133	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
LIVIA305	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
LSRA697	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
CTRA778	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
CTRA729	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
LSRA777	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
TNL180	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
LIVIA164	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
ALRA779	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
TNCT131	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60
TNL179	RFLDKAAMLTPEDHINPDGSAANRWRLCSVQQVEEVKCVLRVPTWFAVIFHLMINQQH	60





Annexe F.IIIa: Alignement de la protéine relative au gène *Sos1* chez les génotypes ancestraux

MSRA948	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
MSRA133	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
MICVN076	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
MSRA847	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
MIVIA238	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
CLIVIA22	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
CTSR729	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
MIVIA482	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
MSRA599	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
TNB1	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
CIVIA202	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
CIVIA567	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
CIVIA560	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
CSRA701	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
PSRA321	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
PSRA673	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
PSRA727	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
PIVIA590	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
PICVN322	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
PIVIA207	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
PSRA610	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
PSRA707	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
POSRA470	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
POSRA293	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
LIVIA164	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
TNCT131	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
TNL179	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
ALSRA779	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
WIVIA626	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
CTIVIA297	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
CTSR16	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
TNCT111	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
TTNCT133	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
LIVIA305	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
LSRA697	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
TNL129	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
LSRA777	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
TNL180	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
CTSR778	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
MSRA896	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
BSRA952	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
BIVIA139	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
BSRA851	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
OIVIA363	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
TNO117	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
TNB3	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
TNB4	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
TNB8	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
TNB12	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
TNB43	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
TNB46	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
TNB158	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
TNB190	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60
TNB11	QVLHVVKTRQVTYSVLNHLIDYIQNLEKVGGLLEEKEMLHLHDAVQLQSDLKRLLRNPPW	60



